



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS NAS CÉLULAS B NORMAIS EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA-B

LILIANA PIRES DA COSTA

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS NAS CÉLULAS B NORMAIS EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA-B

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Mestre Fernando Mendes, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Artur Paiva, meu orientador pela sua orientação científica e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Tiago Carvalheiro e Ana Paula pela preciosa ajuda na realização deste trabalho.

A toda a equipa da Egianálise que me deram o apoio para poder concretizar este trabalho.

À minha família, aos meus pais, e ao meu irmão por me darem sempre o apoio e acreditarem em mim.

Aos meus tios pelo carinho e acolhimento que me deram em Coimbra.

Aos meus amigos e namorado pelo incentivo e ajuda na realização deste trabalho.

A todos o meu obrigada!

Júri

Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor Martin Perez-Andrés, Professor Assistente da Universidade de Salamanca

Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Fernando José Figueiredo Agostinho d'Abreu Mendes, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC-B) é caracterizada pela acumulação monoclonal de linfócitos B CD5⁺ no sangue periférico, medula óssea e nos órgãos linfoides secundários. A imunofenotipagem é essencial para confirmar o diagnóstico. O conhecimento relativo das células B normais residuais da medula óssea destes doentes é no entanto escasso.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a frequência das células B normais na medula óssea nos seus diferentes compartimentos maturativos, células imaturas, hematogónias, células maduras e células plasmáticas. Bem como, caracterizar fenotipicamente as referidas subpopulações, em doentes com LLC-B e em casos normais. E comparar estes dados com as alterações genéticas mais frequentes nesta entidade.

Foram estudadas 43 amostras de aspirados medulares de doentes com LLC-B e o grupo controlo foi constituído por 10 amostras de aspirados medulares normais/reativos.

Verificou-se uma diminuição da percentagem das células plasmáticas e células B maduras normais nos indivíduos com LLC-B quando comparado com o grupo controlo, após exclusão das células B da LLC-B no primeiro grupo. Na avaliação de cada compartimento maturativo também se observaram diferenças na expressão das moléculas estudadas, bem como, o mesmo ocorrendo dentro de subgrupos de LLC-B de acordo com as alterações genéticas presentes.

Após a realização deste trabalho verificou-se alterações numéricas e fenotípicas importantes nas células B normais residuais em doentes com LLC-B.

Palavras-chave

Células B normais, Leucemia Linfocítica Crónica-B, Imunofenótipo.

Abstract

The chronic lymphocytic leukemia (CLL-B) is characterized by the accumulation of monoclonal CD5+ B lymphocytes in the blood, bone marrow and lymphoid tissues. Immunophenotyping is essential to confirm the diagnosis. The knowledge concerning the residual bone marrow normal B cells from these patients is still scarce.

The aim of this study was to quantify the frequency of normal B cells in the bone marrow in its different maturational compartments, immature cells, hematogones, mature cells and plasma cells. Characterize phenotypically these subpopulations in CLL-B patients and in normal cases, and compare the obtained results among different CLL-B subgroups according to most common genetic abnormalities in this entity.

In this study were evaluated 43 marrow aspirates from CLL-B patients and 10 normal bone marrow aspirates.

There was a decrease in the percentage of plasma cells and mature B cells in CLL-B group when compared with the control group. We also found differences in the expression of several molecules on B cells from CLL-B group, some of them with a clear relation with the presence of a specific genetic abnormality.

In this work it was verified numerical and phenotypic changes in residual normal bone marrow B cells from patients with CLL-B.

Keywords

B normal cells, Chronic Lymphocytic Leukemia-B, Immunophenotype.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas	vi
I- Introdução.	1
1.1 Maturação das células B	2
1.1.1 Maturação e diferenciação da célula B na medula óssea: Independente da presença de antigénio.....	2
1.1.2 Diferenciação da célula B nos tecidos linfoides secundários: Dependente da presença de antigénio.....	6
1.1.3 Populações de Células B periféricas.....	8
2. Doenças linfoproliferativas crónicas de Célula B.....	11
2.1 Leucemia Linfocítica Crónica-B.....	15
3. Linfocitose Monoclonal de Linfócitos B (LMB).....	23
II-Objetivos do trabalho.....	26
III- Material e métodos.....	27
3.1 Análise fenotípica das células B por Citometria de Fluxo.....	28
3.2 Isolamento das células B por <i>cell sorting</i>	30
3.3 Análise das alterações genéticas	30
3.4 Análise estatística.....	31

IV- Resultados	32
4.1 Frequência de células B nos diferentes compartimentos maturativos.....	32
4.2 Caracterização fenotípica das células B normais nos diferentes compartimentos maturativos.....	33
4.3 Frequência de células B em cada estágio maturativo/expressão dos diferentes receptores estudados e sua relação com as alterações genéticas detetadas por FISH.....	35
4.3.1 Células B imaturas CD34 ⁺	35
4.3.2 Hematogônias.....	37
4.3.3 Células maduras.....	39
4.4.4 Plasmócitos.....	41
V- Discussão.....	43
VI- Conclusão.....	48
VII- Bibliografia.....	49

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento das células B.....	2
Figura 2 : Classificação das células B de acordo com as suas características fenotípicas, durante a maturação na medula óssea e nos órgãos linfoides secundários. (Perez-Andres et al., 2010)	10
Figura 3: Imagem representativa da diferenciação da célula B e o local de origem dos Síndromes Linfoproliferativos Crônicos da Célula B. (Jafle,2008)	11
Figura 4: Expressão, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas estudadas nos diferentes compartimentos maturativos das células B no grupo de LLC-B e no grupo controlo.....	34
Figura 5: Frequência das células B imaturas CD34+ em função das alterações genéticas estudadas no grupo LLC-B, nos indivíduos com LLC-B sem alterações genéticas e no grupo controlo.....	35
Figura 6: Expressão das moléculas CD43, CD10 e CD38, dada pela média de intensidade de fluorescência nas células B imaturas CD34+ para as diferentes alterações genéticas no grupo LLC-B, no grupo de LLC-B sem alterações genéticas e no Grupo Controlo.....	36
Figura 7: Frequência das células hematogónias em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.....	37
Figura 8: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD10 e CD43 nas células hematogónias em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo.....	38
Figura 9: Frequência das células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.....	39

Figura 10: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD23, CD200 e CD79b nas células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo.....40

Figura 11: Frequência das células plasmáticas em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.....41

Figura 12: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD43, CD38 e CD200 nas células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo.....42

Índice de tabelas

Tabela I: Classificação das neoplasias linfóides de células B maduras proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Adaptado de Harris, et al.)	13
Tabela II. Estádios clínicos da LLC-B segundo as classificações de Rai <i>et al</i> e de Binet <i>et al</i>	20
Tabela III. LLC-B: Outros fatores prognósticos adicionais aos parâmetros individuais incluídos nas classificações de Rai e de Binet.....	21
Tabela IV: Caraterísticas dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação das células no Tubo Srenning para Doenças Linfoproliferativas T, B e NK.....	28
Tabela V: Caraterísticas dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação das células no Tubo para o diagnóstico de LLC-B.....	29
Tabela VI: Percentagem, dada pela média \pm desvio padrão, das células B nos diferentes compartimentos maturativos no grupo de LLC-B e no Grupo controlo. Significado estatístico quando $p < 0,05$	32

Lista de Abreviaturas

Ac- Anticorpo

Ag- Antígeno

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

AID- *activation-induced cytidine*

BCR- *B Cell Receptor*

BCL-2- *B Cell Lymphoma 2*

BCL-6- *B Cell lymphoma 6*

CD- *Cluster of Differentiation*

CEH- Célula Estaminal Hematopoiética

Cy- Intracelulares

CSM- *Class switch recombination*

CXCR2- *Chemokine receptor type 2*

CXCR4- *Chemokine receptor type 4*

E2A- *Encoded Transcription Factor*

EBF1- *Early B Cell Factor 1*

FISH- *Fluorescence in situ hybridization*

FSC: dispersão frontal de luz ou tamanho celular

HCL- *Leucemia de Hairy Cell*

IgM- Imunoglobulina M

IgVH- Região variável da cadeia pesada da imunoglobulina

IL-7- Interleucina 7

IRF-4- *interferon regulatory factor 4*

ITAM - *Immunoreceptor Tyrosine Activate Motifs*)

LCM- Linfoma de Células do Manto

LDCG- Linfoma Difuso Células Grandes

LF- Linfoma Folicular

LDH- Lactato Desidrogenase

LMB- Linfocitose Monoclonal de Linfócitos B

LLC- Leucemia Linfocítica Crônica

LPL- Linfoma Linfoplasmático

LZM- Linfoma da Zona Marginal

MALT- Tecidos Linfoides associados a mucosas

MITF- *Microphthalmia associated transcription factor*

N- nuclear

NH₄CL- Cloreto de Amônia

NL- Nódulos Linfáticos

PAX-5- *Paired Box Protein 5*

PLL- Leucemia Prolinfocítica

PU.1- Fator de Transcrição

RAG- *Recombinase Activating Gene*

SLPC-B- Síndromes Linfoproliferativos Crônicos de Célula B

SCF- Fator das Células *Stem*

Sm- Superfície membranar

SSC- dispersão lateral de luz

Syk- *Spleen Tyrosine Kinase*

TDT- Desoxirribonucleotransferase terminal

TCR- *T Cell Receptor*

VLA-4- *Very Late Antigen 4*

VLAM-1- Molécula 1 de adesão celular vascular

XBP-1- *X-box binding protein 1*

I. Introdução

O sistema imune é constituído por uma variedade de células, fatores solúveis e estruturas organizadas (órgãos linfóides), que asseguram o equilíbrio homeostático do organismo e a sua proteção contra invasores externos ou células alteradas do próprio.

Os linfócitos são células fundamentais nas respostas imunológicas devido à capacidade de reconhecerem especificamente um vasto leque de substâncias antigénicas (Virella et al., 2001, Acosta-Rodriguez, 2007). Destes fazem parte as células B que se caracterizam por apresentarem na sua superfície imunoglobulinas que funcionam como recetores de antígenos. Após uma estimulação adequada estas células diferenciam-se em células plasmáticas capazes de produzir anticorpos específicos contra substâncias estranhas que invadam o organismo. Também desempenham a função de células apresentadoras de antígenos, que normalmente é efetuada pelos macrófagos e células dendríticas (Virella et al, 2001).

Numa fase embrionária as células B têm origem no saco vitelino e na fase fetal no fígado e medula, estando limitado posteriormente numa fase adulta à medula óssea. Após a sua maturação na medula óssea migram para as áreas foliculares dos tecidos linfóides, representando entre 5% a 25% de todos os linfócitos do sangue periférico. Na medula óssea são as células B, dentro da população de linfócitos, as mais representadas, o mesmo se passando nos gânglios linfáticos. As células B maduras circulam entre os gânglios linfáticos e o baço onde podem encontrar um determinado antígeno e serem ativas pelas células T e pelas células dendríticas nos locais extra foliculares. Como consequência, entram nos folículos e proliferam formando os centros germinativos e diferenciam-se em células plasmáticas e células de memória (Cruse, 2010, Carsetti, 2000. Desta forma, as células B adquirem a capacidade de produzir imunoglobulinas específicas contra uma elevada variedade de antígenos que possam encontrar ao longo da vida. Porém, o organismo não armazena todas as células B necessárias para uma resposta ótima contra um número infinito de antígenos; em vez disso, apresenta um repertório menos complexo de células B, desenvolve os seus clones individuais de acordo com as necessidades e circunstâncias (Goldsby, 2006).

1.1. Maturação das Células B

A maturação das células B ocorre em duas etapas que se localizam em diferentes tecidos: i) a diferenciação dos precursores de células B a partir de uma célula estaminal hematopoiética (CEH) até uma célula B *naïve* madura, na medula óssea (MO); e (ii) a maturação em células B de memória/efetoras, nos tecidos linfoides secundários – nódulos linfáticos (NL) e tecidos linfóides associados a mucosas (MALT) – na MO e baço (Perez-Andres et al., 2010).

O principal propósito do processo de maturação das células B consiste em estabelecer uma população diversa de células B periféricas auto tolerante e reativa a antígenos estranhos. Para assegurar estas duas características, o processo maturativo da célula B é determinado pelas características estruturais e capacidade de sinalização do receptor da célula B e pode ser dividido em quatro fases (Figura 1).

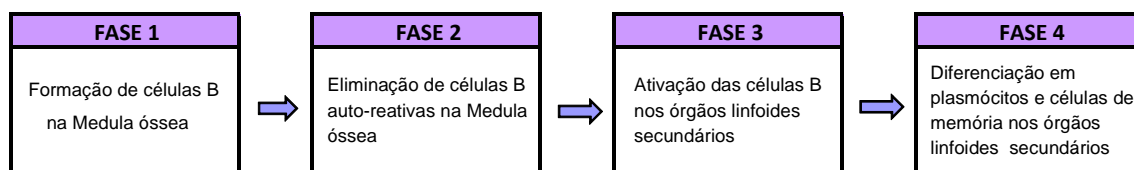


Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento das células B.

1.1.1 Maturação e diferenciação da célula B na medula óssea: Independente da presença de antígeno

As células estromais da medula óssea são elementos chaves na maturação das células B providenciando contactos célula-célula específicos e diversas citocinas solúveis. Estas células juntamente com os osteoblastos e osteoclastos, células T e outros leucócitos (p.e., células dendríticas), formam nichos específicos que oferecem as condições microambientais necessárias para a maturação de cada subtipo de célula B.

A diferenciação linfóide B tem início no fígado fetal e na medula óssea fetal e adulta, onde os genes das Ig passam por um processo de recombinação somática V(D)J que assegura a expressão membranar de uma molécula Ig funcional e única nas células

B imaturas. Assim, com base no *status* dos genes das cadeias das Ig e na expressão de uma variedade de proteínas da superfície membranar (Sm) e intracelulares (Cy), cinco estádios principais de maturação da célula B podem ser identificados nos precursores de célula B medulares: pro-B, pré-B-I, pré-B-II, imaturas, e *naïve* (Nagasawa, 2006) (Figura 2).

Durante as primeiras etapas do processo de diferenciação da célula B, os precursores medulares comprometem-se à linhagem de célula B através de interações VLA-4/VCAM-1 e c-kit/SCF com células estromais (Carsetti, 2000, Goldsby, 2006). Estas células pro-B expressam CD22 e CD45 de forma débil juntamente com marcadores de imaturidade, como o CD34 e níveis elevados de CD38; enquanto o CD19 permanece ausente neste estágio (Ciudad, 1998, Perez-Andres et al., 2010). Estas células pro-B expressam na sua membrana a molécula CXCR4 (a qual permite a sua interação com células que expressam CXCL2) e não se encontram ainda totalmente comprometidas à linhagem de precursores B.

Tal só ocorrerá após a sua migração para diferentes nichos onde estão presentes células produtoras de IL-7 (Carsetti, 2000, Goldsby, 2006). A interação da IL-7 com o seu recetor (CD127) expresso em progenitores de célula B promove a produção de vários fatores de transcrição (e.g., Pax-5, PU.1, EBF-1, E2A), os quais induzem a síntese de transferase (TdT) e recombinases (*recombinase activating gene*, rag1 e rag2), que são necessárias para iniciar a recombinação somática entre os segmentos de genes D e J do locus da IGH (Medvedovic, 2011, Tokoyoda, 2004). As proteínas recombinases (incluindo, rag1 e rag2) seleccionam e justapõem ao acaso um segmento de cada uma destas duas regiões de genes e eliminam o DNA intercalar. Enquanto isso, TdT adiciona ao acaso nucleótidos aos exões que se justapõem, aumentando desta forma a variabilidade do BCR. Após a expressão de pax-5, as células pro-B tornam-se comprometidas à linhagem de células B, designando-se de células pré B-I, e expressam pela primeira vez CD19 na sua membrana juntamente com o fenótipo CD10⁺⁺CD38⁺⁺CD34⁺CD79a⁺ e a expressão nuclear (n) de TdT. Durante esta etapa o reordenamento do locus das IGH é completado com a junção de um segmento V ao D-J pré formado. Após a formação de um exão VDJ funcional, este será por sua vez justaposto com exões Igμ constantes, gerando uma cadeia pesada Igμ. Estas células com Igμ intracelular (Cy-Igμ) são denominadas de células pré B-II e apresentam uma expressão membranar heterogénea de CD20, acompanhada da expressão de CD45 na ausência de CD34 e nTdT (Medvedovic, 2011, Tokoyoda, 2004).

Esta Ig μ será expressa a baixos níveis na superfície das células pré-B juntamente com proteínas invariáveis substitutas das cadeias leves (IgL), VpreB e k5. Estas últimas serão substituídas pelas IgL cujo *locus* permanece por rearranjar durante estes primeiros estadios de maturação da célula B. As proteínas sinalizadoras Ig α e Ig β (CD79a e CD79b) são também expressas para formar juntamente com Ig μ , VpreB e k5 o pré-recetor das células B (pré-BCR). Se o pré-BCR for capaz de interagir com o microambiente da MO, os domínios ITAM (*immunoreceptor tyrosine activate motifs*) das Ig α e Ig β são fosforilados e os seus sinais salvam estas células da apoptose (Goldsby, 2006). Esta selecção positiva assegura que a Ig μ formada é funcional, eliminando todas aquelas células com reordenamentos não produtivos dos genes IgH (aproximadamente metade de todas as células pré-B geradas). Além do mais, a sinalização através do pré-BCR induz a proliferação destes precursores de células B e o reordenamento dos genes IGL.

Assim, após a expressão e activação do pré-BCR, as células pré-B-II começam a proliferar, designando-se de células precursoras de grande tamanho pré-B-II pré-BCR⁺ e as enzimas RAG e TdT são reguladas negativamente de forma a prevenir novos reordenamentos génicos IgH no segundo alelo que potenciem a formação de mais um alelo funcional, enquanto asseguram a selecção de clones de células com reordenamentos produtivos VDJ – processo de exclusão alélica. Esta fase de expansão clonal é seguida da paragem no ciclo celular em G1, durante o qual a expressão das IgL de superfície é regulada negativamente e as células perdem a expressão do pré-BCR (células de pequeno tamanho pré-B-II pré-BCR⁻). Os genes RAG são então novamente expressos e as proteínas rag, estáveis durante a fase G1 vão permitir novas recombinações V(D)J. A recombinação dos genes das cadeias leves das Ig (IgK e Ig λ) é iniciada na transição entre estes dois estádios. Assim, após o reordenamento completo VDJ, os segmentos de genes VH, mas não os JH, tornam-se menos acessíveis em paralelo com um aumento da acessibilidade do *locus* IgK. A activação da recombinação do *locus* IgK ocorre inicialmente via desmetilação de um alelo que desempenha um importante papel na exclusão isotípica, sendo o *locus* Ig λ ativado num estágio mais tardio.

A expressão de uma molécula IgM completa na superfície da célula depois dos dois loci IGH e IGL terem sido rearranjados, é primeiramente descrito no compartimento de células B imaturas (LeBien et al., 2008, Perez-Andres et al., 2010).

Estas células imaturas já compartilham a maioria das características fenotípicas das células B *naïve* maduras, incluindo a expressão elevada de CD20 e CD45, mas contrariamente, elas ainda retêm a expressão débil de CD10 e forte positividade para CD38 (Ciudad, 1998, Perez-Andres et al., 2010). Então, estas células passam por um processo de selecção negativa antes de completarem a sua maturação para eliminar aquelas células que apresentem um BCR auto reativo. As células imaturas que reconheçam Ag do próprio na MO têm a oportunidade de rearranjar outra vez os *loci* das Ig por edição do seu BCR (processo denominado de *receptor editing*) (Arosa, 2007). Se produzirem um BCR auto reativo as células serão eliminadas ou tornar-se-ão anérgicas dependendo da afinidade para os Ag do próprio. As células imaturas que passem com sucesso este processo de selecção irão tornar-se células B *naïve* maduras, nas quais começa a ser expressa a cadeia pesada δ . Ao contrário de outros isótipos, IgD é expressa como resultado do *splicing* do RNA e não do DNA. Tal processo preserva o locus μ e permite a co expressão de IgM e IgD nas células maduras. Nestas é induzida a expressão de CD22 e é perdida a expressão de CD10 e CD38 (Perez-Andres et al., 2010). Esta parte do processo de diferenciação da célula B tem então lugar na ausência de antígenos estranhos e uma vez finalizada as células B *naïve* IgM⁺IgD⁺ maduras imunocompetentes (capazes de formar uma resposta imune) e não auto reativas podem abandonar a medula óssea e circular pela periferia onde poderá ocorrer a estimulação por antígenos estranhos (Goldsby, 2006).

1.1.2. Diferenciação da célula B nos tecidos linfóides secundários: Dependente da presença de antígeno

As células B *naïve* CD27⁻CD20⁺CD19⁺CD38⁻ que se encontram numa fase G0 do ciclo celular deixam a medula óssea, circulam pelo sangue periférico e entram nos nódulos linfáticos pela zona de células T através das vénulas de epitélio alto (HEV), onde tem lugar a última etapa do processo de diferenciação da célula B. Caso não encontrem um antígeno, elas deixam os nódulos linfáticos através dos vasos linfáticos, circulam novamente entre o sangue periférico e os tecidos linfóides, e morrerão dentro de alguns dias (Tangye e Tarlinton, 2009).

No entanto, as células B *naïve* que reconhecem o seu antígeno apresentado por células dendríticas foliculares, contactam com células T activadas por esse antígeno específico, são activadas e migram para o centro germinativo.

As células T activadas providenciam um segundo sinal de activação às células B via CD40L que interage com CD40 expresso pelas células B, assim como via CD80/CD86-CD28. No centro germinativo, as células B encontram-se continuamente em migração entre a zona escura (**centroblastos**) e clara (**centrócitos**) (Allen, Okada, & Cyster, 2007). Na zona escura, as células proliferam rapidamente e sofrem hipermutação somática (SHM) dos exões V(D)J das suas IgH e IgL de forma a otimizar a ligação ao antígeno pela introdução de mutações pontuais, e podem modificar as suas funções efectoras pela troca de isotipo da região constante IGH de μ para α , δ , ϵ , ou γ (*class switch recombination*, CSR). Esta mudança da classe IgM para as outras classes IgG, IgE ou IgA é regulada por sinais transmitidos pelos linfócitos Th, nomeadamente pela interação CD40/CD40L e por citocinas segregadas por estas células. Este último processo ocorre pela recombinação de 2 regiões de *switch* com a consequente substituição da região C μ por outra região constante, sem alteração do exão VDJ precedente, ou seja, da sua especificidade. Ambos os mecanismos moleculares de CSR e SHM são dependentes da participação de duas enzimas, *activation-induced cytidine* (AID) e *uracil-DNA glycosylase* (UNG). A primeira converte nucleotídeos de citidina em uracilo e a segunda remove o uracilo, permitindo a sua substituição por qualquer um dos quatro nucleótidos facilitando a ocorrência de SHM. Desta forma, tanto as SHM como CSR, têm de ser rigorosamente controlados, uma vez que a introdução de mutações e rupturas da cadeia dupla do DNA podem não só representar um risco para a longevidade da célula B, mas também resultar na ocorrência de translocações e mutações de oncogenes.

Na zona clara, os centrócitos reencontram o antígeno e é testado se os eventos anteriores resultaram num aumento da afinidade do BCR pelo antígeno (Maturação por afinidade). Esta última etapa resulta na sobrevivência e proliferação de clones de células B com alta afinidade do BCR para o antígeno. A indução da expressão de CD10, CD38, CD95, e HLA-DR e diminuição da expressão de CD44 e bcl2 permite discriminar as células B do CG dos outros subtipos de células B nos NL (p.e., células naïve, memória e plasmoblastos), juntamente com uma positividade heterogénea para outros marcadores relacionados com a diferenciação para o compartimento memória, como o CD27. Apesar da expressão elevada de CXCR4 e CD77 nos centroblastos, comparativamente com a observada em centrócitos, não existe um consenso acerca das diferenças fenotípicas entre estes dois subtipos celulares. Por fim, nas células B comprometidas a células plasmáticas é induzida a expressão de factores de transcrição, como o blimp, xbp-1 e irf-4, que por sua vez suprimem os factores de transcrição pax-5, bcl-6 e mitf que controlam o programa de expressão genética que define as células B *naïve* e do centro germinal. Tal inibe futuras SHM e CSR, induz a secreção de Ac, alterações nas proteínas de membrana e propriedade de *homing* das células (Allen et al., 2007, Tangye e Tarlinton., 2009).

Importa ainda referir que estes linfócitos B ativados podem adotar dois destinos distintos: parte segue para as áreas extra foliculares onde prolifera e diferencia-se em células plasmáticas com um tempo de vida curto, produzindo anticorpos que participam numa primeira linha de defesa, enquanto outros migram para os folículos dos órgãos linfoides secundários, onde proliferam rapidamente e formam os centros germinativos descritos anteriormente (Tangye e Tarlinton, 2009).

1.1.3 Populações de Células B periféricas

Após vários ciclos de proliferação e dos processos de maturação de afinidade nos centros germinativos, as células B diferenciam-se em células plasmáticas ou células de memória (Figura 2). Estas últimas voltam novamente no sangue periférico, enquanto as células plasmáticas migram para a medula óssea ou MALT para completarem o seu processo de diferenciação e produzirem anticorpos de elevada afinidade para o antígeno.

As células B de memória (aproximadamente 20 – 30% de toda as células B do sangue periférico em adultos) passaram por SHM apresentando as suas regiões IG VH mudadas, e cerca de metade também já passou por CSR das Igs, o que se reflecte na expressão variável de SmlgH ($23\% \pm 10\%$ e $21\% \pm 9\%$ das células B de memória do sangue periférico no adulto expressam SmlgG e SmlgA, respetivamente) (Perez-Andres et al., 2010). Estas células são desde há muito identificadas com base na expressão de CD27 e podem ainda expressar $IgD^+ IgM^+$, $IgD^- IgM^+$, IgD^+/ IgA^+ , representando respetivamente 15%, 10% e 15% dos linfócitos B que circulam no sangue periférico (Fecteau e Néron, 2003).

O CD27 é um marcador que aparece na superfície das células B de memória após a estimulação antigénica. É essencial para a diferenciação dos linfócitos B de memória em plasmócitos, através da sua interação com os linfócitos T helper, contribuindo para o início da resposta imune secundária (Wang et al., 2012). Esta resposta é caracterizada pela expansão acelerada de linfócitos B de memória e a sua rápida diferenciação em plasmócitos produtores de anticorpos com elevada afinidade para o antígeno, mas com um tempo de vida curto (Tangye e Tarlinton, 2009).

Células com características morfológicas, fenotípicas e funcionais de células plasmáticas são também detectadas, em reduzido número, no sangue periférico de um adulto em estado basal. A maioria destas células pensa-se corresponderem a plasmoblastos recém-formados que migram dos tecidos linfóides secundários para nichos na medula óssea, MALT, ou tecidos inflamados. Em conjunto com estas células, as células plasmáticas que deixam a medula óssea e as mucosas podem ser detectadas no sangue periférico em condições de ativação imune. Este compartimento representa cerca de 1% – 3% ($1 - 5 \text{ cells}/\mu\text{L}$) de todas as células B no sangue periférico de um adulto saudável em condições basais, no entanto sob condições específicas pode alcançar frequências mais altas que todas as restantes células B circulantes (p.e. em infeções agudas).

Em contraste com as células B de memória, a IgA representa a imunoglobulina mais frequentemente expressa nos plasmoblastos/células plasmáticas ($49\% \pm 12\%$ de todos os plasmoblastos/células plasmáticas do sangue periférico), com cerca de $18\% \pm 12\%$ de células SmlgM⁺ e $13\% \pm 11\%$ SmlgG⁺. Em adultos saudáveis, cerca de $14\% \pm 12\%$ dos plasmoblastos/células plasmáticas circulantes não expressam nenhuma slg e menos de 5% destas células são SmlgD⁺SmlgM⁻, as quais têm sido associadas com respostas imunes do tracto respiratório superior. Inclusive, a distribuição das cadeias leves das imunoglobulinas também é heterogénea dentro dos diferentes compartimentos de células B circulantes. Os plasmoblastos/células plasmáticas apresentam ratios κ/λ mais baixos comparativamente com as restantes células B. Em particular, aqueles que expressam apenas SmlgD (SmlgM⁻) expressam maioritariamente Smlg κ mas são oligoclonais por sequenciação de DNA.

Tendo em conta os diferentes tempos médios de vida dos anticorpos (variando de poucos dias para a IgA e IgM, a várias semanas para a IgG a memória humoral é assegurada pela secreção contínua de anticorpos pelas células plasmáticas de longa vida estabelecidas em nichos onde se encontram os fatores necessários para a sua sobrevivência e diferenciação. A competição entre plasmoblastos recém-formados e células plasmáticas de longa vida residentes nestes nichos resulta na morte da maioria dos plasmoblastos circulantes e na recirculação das células plasmáticas substituídas em busca de novos nichos noutros locais.

Além de todas as populações linfóides B anteriormente referidas, no sangue periférico de adultos saudáveis também se detecta de forma sistemática, embora em reduzida frequência (de 2%-4% do total de células B em adultos, cerca de 1-5 células/ μ L), células B imaturas ou transicionais (Figura 2). Estas células foram inicialmente equiparadas, em termos fenotípicos, às células B “transicionais” identificadas em ratinho, mas sabe-se actualmente que correspondem a células B imaturas que abandonam a medula óssea durante o processo de selecção negativa. Assim, estas células apresentam características fenotípicas de um linfócito B imaturo (CD19⁺, CD10⁺, CD24⁺, CD38⁺), co expressam SmlgM e SmlgD, carecem de mutações dos genes IGH e apresentam uma capacidade *in vitro* para proliferar e se diferenciarem a célula secretora de anticorpos claramente inferior àquela apresentada pelas células B *naïve* maduras (cerca de 60 – 70% das células B em circulação). Desta forma representam um compartimento celular heterogéneo, constituído por células aparentemente em diferentes

fases de maturação, entre os estádios de célula B imatura e de linfócito B *naïve* maduro. No sangue periférico o seu número surge aumentado em crianças e doentes com patologias autoimunes e outras patologias com base imunológica (p.e. lúpus eritematoso sistémico, imunodeficiência comum variável e doenças linfoproliferativas ligadas ao cromossoma X) e durante o processo de regeneração da medula óssea após transplante hematopoiético, geralmente associado a uma diminuição do número de células B de memória. Existe a possibilidade (embora não demonstrada) de que em humanos algumas destas células possam concluir a sua maturação na periferia, actuando como células B reguladoras humanas, ou que possam passar por um processo de transformação neoplásica. Finalmente há ainda a salientar um maior ratio κ/λ neste compartimento celular comparativamente ao das restantes subpopulações de células B circulantes (cerca de 2,0 vs 1,5, respetivamente).

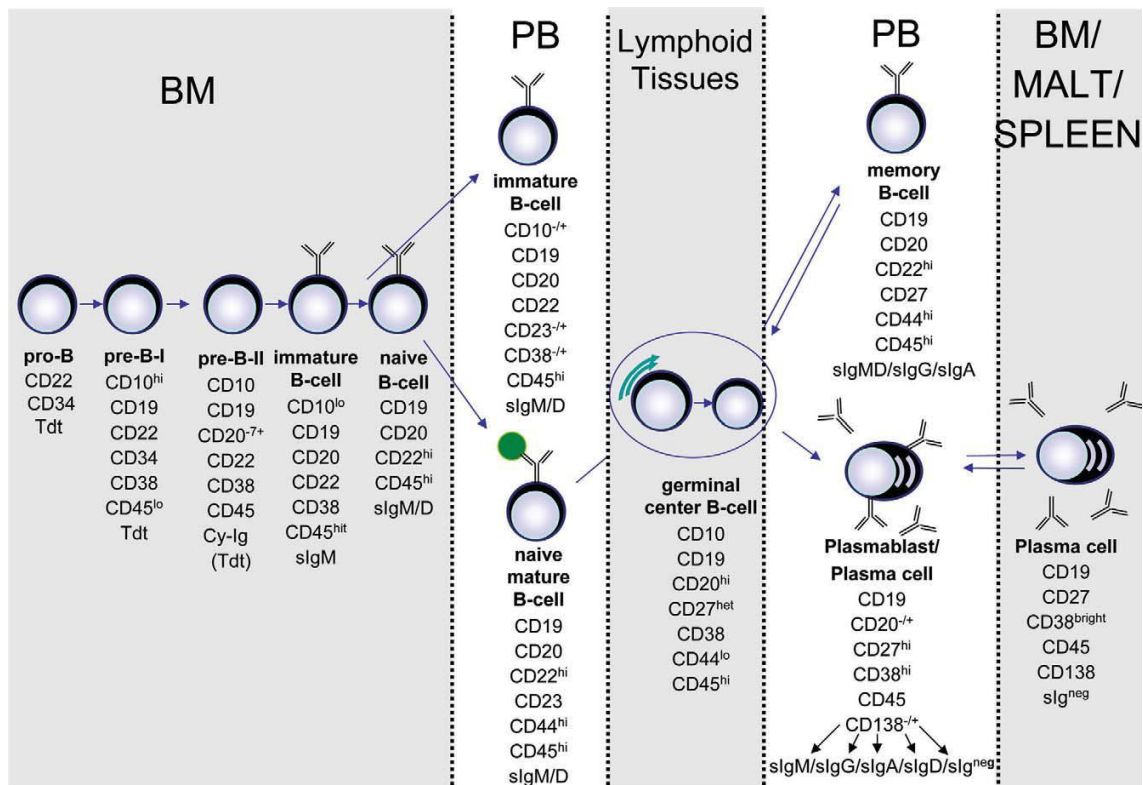


Figura 2: Classificação das células B de acordo com as suas características fenotípicas, durante a maturação na medula óssea e nos órgãos linfóides secundários (Perez-Andres et al., 2010).

2. Doenças linfoproliferativas crônicas de Célula B

As doenças linfoproliferativas crônicas de Célula B (DLPC-B) constituem um grupo de neoplasias hematológicas clinicamente heterogêneas e relativamente frequentes, que resultam de uma expansão monoclonal na qual uma única célula B transformada de aparência madura bloqueada em um estágio particular de diferenciação (desde a célula B naíve até à célula B diferenciada) adquire a capacidade de originar uma população de células com uma mutação original, reordenamentos comuns das regiões gênicas VDJ das IgH, e expressão restrita das IgL. Esta proliferação celular pode ter diferentes origens e ocorrer com expressão predominante em medula óssea e/ou em sangue periférico, ou pode ter lugar preferencialmente nos órgãos linfóides secundários sem infiltrar a circulação periférica (Figura 3) (Van Lochem et al., 2004, Dronca et al., 2011).

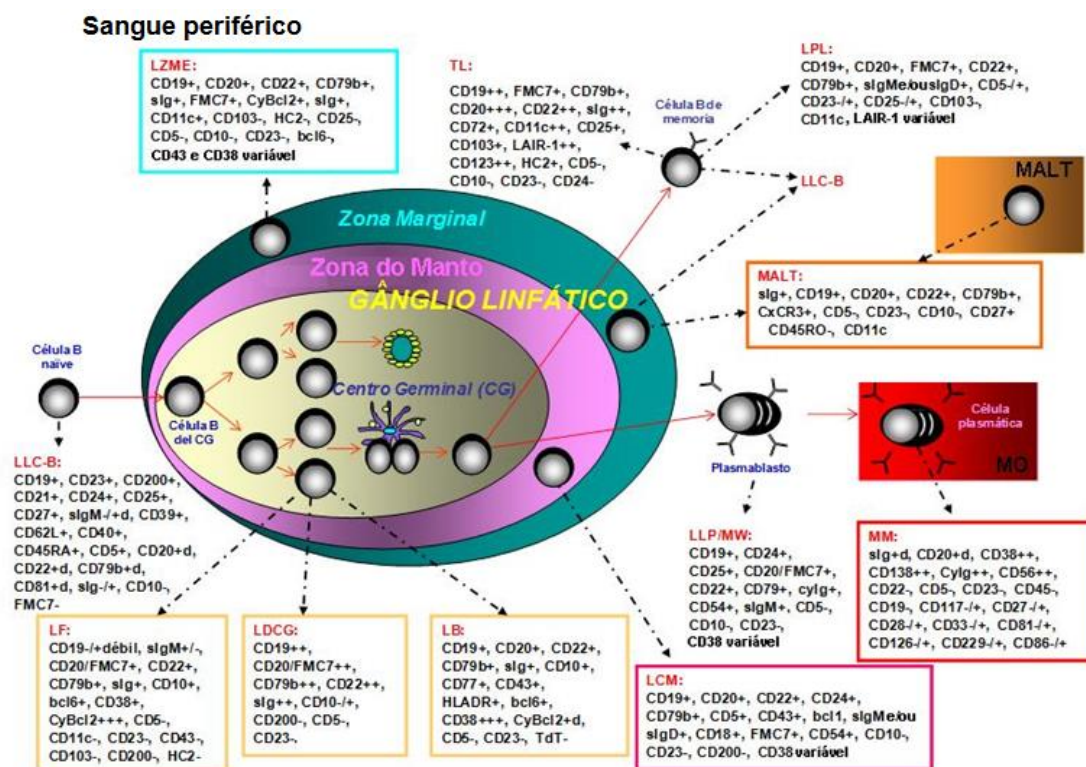


Figura 3: Origem das DLPC-B de acordo com as similaridades fenotípicas com a sua contrapartida normal. (Jafle,2008).

A relativa facilidade em aceder à célula tumoral a partir de uma punção venosa de medula óssea, sangue periférico, ou tecido linfóide, juntamente com o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas para a análise das suas características biológicas, impulsionaram de forma notável os avanços no diagnóstico e avaliação prognóstica das DLPC-B. Apesar das diferentes estratégias metodológicas disponíveis, é importante referir que estas habitualmente proporcionam uma informação distinta e complementar. De entre elas a análise multiparamétrica por citometria de fluxo surge como o método de eleição para o estudo individual das características fenotípicas das células, inclusivamente naquelas DLPC-B com infiltração restrita dos órgãos linfóides secundários, como os gânglios, baço ou a pele, entre outros.

Assim, a classificação diagnóstica actual das SLPC-B inclui, além dos critérios clínico-biológicos, citomorfológicos e histológicos convencionais, a informação derivada dos estudos imunofenotípicos e da análise genético/molecular, para a definição de entidades diagnósticas concretas (Tabela 1).

Tabela I. Classificação das neoplasias linfóides de células B maduras proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Adaptado de Harris, et al.)

Leucemias crônicas de célula B maduras / periféricas
Leucemia linfática crônica de célula B/ linfoma linfocítico de célula B pequena
Leucemia prolinfocítica de célula B
Tricoleucemia
Linfomas de célula B maduras / periféricos
Linfoma da zona marginal esplênica
Linfoma da zona marginal extranodal tipo MALT ^a
Linfoma da zona marginal nodal
Linfoma folicular
Linfoma de células do manto
Linfoma B difuso de célula grande
Linfoma plasmoblástico
Linfoma de Burkitt
Linfoma de célula B inclassificável
Linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldeström
Neoplasias de células plasmáticas
Mieloma múltiplo / plasmocitoma

^a Tecido linfoide associado a mucosas.

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), dentro das DLPC-B primariamente leucémicas incluem-se a leucemia linfática crônica B (LLC-B), a leucemia prolinfocítica B (LPL-B), e a tricoleucemia (TL), tanto nas suas formas clássicas como atípicas e variantes.

Nestas três entidades habitualmente ocorre a infiltração inicial do sangue periférico e/ou da medula óssea, embora com frequência se observe também envolvimento do baço e/ou dos gânglios linfáticos (Dronca et al., 2010). De entre os linfomas primários que mais frequentemente progridem com leucemização, destaca-se o linfoma folicular (LF), o linfoma de células do manto (LCM), o linfoma da zona marginal

esplénica (LZME), o linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) e o linfoma linfoplasmocítico (LLP)/macroglobulinemia de Waldeström (MW); nestas entidades são normalmente os gânglios linfáticos e/ou o baço, os órgãos inicialmente afectados. O linfoma linfocítico de célula B pequena (LLCBP), embora se defina como um linfoma ganglionar, apresenta características sobreponíveis à LLC-B, razão pela qual também é incluído na classificação da OMS junto com esta entidade (Tabela 1).

Partindo do conceito que do ponto de vista fenotípico, as células neoplásicas de doentes com DLPC-B, reflectem as características das células normais da linha linfóide B, bloqueadas em estádios maturativos concretos, constatou-se que apesar das similaridades fenotípicas existentes com os linfócitos B normais, as células neoplásicas com frequência apresentam alterações nos seus padrões de expressão de proteínas normais - fenótipos aberrantes. Nas DLPC-B estas alterações fenotípicas consistem habitualmente em: 1) expressão assíncrona de proteínas associadas à maturação celular (assincronismos maturativos), 2) reatividade anormalmente elevada (sobre expressão antigénica) ou diminuída de um antígeno (sub-expressão antigénica), 3) fenótipos associados a características alteradas de dispersão de luz (FSC: dispersão frontal de luz ou tamanho celular, e; SSC: dispersão lateral de luz ou complexidade interna da célula) e/ou 4) fenótipos ectópicos. Em contraste com o que ocorre nas leucemias agudas, nas DLPC-B a expressão de antígenos associados a uma linha celular distinta nas células neoplásicas constitui um achado pouco frequente.

Por tudo isto, atualmente a caracterização imunofenotípica das DLPC-B visa a identificação, não só das similaridades existentes entre a célula B neoplásica expandida e a sua contrapartida normal para a identificação da linha celular e estádio maturativo da mesma, como também das suas diferenças. Estudos recentes realizados em neoplasias de precursores B e alguns subtipos de DLPC-B sugerem que a expressão alterada de antígenos associados a distintos estádios maturativos nas células neoplásicas reflecte alterações genéticas subjacentes ou anomalias na comunicação entre a célula expandida e o seu microambiente (Orfão et al., 2008).

Do ponto de vista molecular, a maioria das neoplasias linfóides tem origem num processo de modificação do DNA genómico pelo qual as células B passam durante a sua diferenciação (p.e. pela ocorrência de recombinação V(D)J, mutações somáticas, e troca de classe de imunoglobulina). Desta forma, a análise dos genes das imunoglobulinas tornou-se actualmente uma ferramenta fundamental para compreender a origem deste tipo de neoplasias de célula B.

2.1. Leucemia Linfocítica Crónica-B

A LLC-B é uma DLPC-B primariamente leucémica, caracterizado pela presença de uma linfocitose monoclonal absoluta e progressiva ($> 5 \times 10^9$ células B/L). Nesta entidade as células B têm aparência madura e aumento em número no sangue periférico, medula óssea e/ou outros órgãos linfóides. A LLC-B constitui a leucemia mais frequente nos países ocidentais, representando aproximadamente 30% de todas as leucemias e 10% de todas as neoplasias hematológicas, aumentando claramente esta incidência com o avançar da idade (Montserrat e Moreno, 2008).

Embora na actualidade as causas que originam a doença sejam desconhecidas, sabe-se que a existência de antecedentes familiares constitui um dos fatores de risco mais evidentes que predispõem a padecer desta neoplasia (Montserrat e Moreno, 2008).

Características Clínicas da LLC-B

Do ponto de vista clínico, a LLC-B é uma doença heterogénea, na qual a maioria dos doentes diagnosticados são assintomáticos, embora em determinadas circunstâncias a doença manifesta-se clinicamente como um SLPC típico e os doentes apresentam sintomas constitucionais (p.e. astenia), esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias e infiltração extranodal, e muitas vezes a presença de anemia hemolítica autoimune e infeções (Montserrat & Moreno, 2008). Além do mais, a heterogeneidade da doença reflecte sobretudo a grande variabilidade em termos de evolução e prognóstico entre os distintos doentes. Assim, aproximadamente metade dos casos apresenta um curso clínico relativamente indolente, enquanto a outra metade dos doentes progride de forma mais rápida. Hoje sabe-se que os doentes com risco de progressão, diagnosticados numa fase inicial da doença, podem beneficiar de um tratamento precoce, antes que ocorra a sua progressão. Por este motivo, torna-se fundamental identificar marcadores prognósticos fiáveis, sobretudo nas fases iniciais da doença, que permitam avaliar a utilidade de novas opções de tratamento, como o uso combinado de quimioterapia e/ou imunoterapia, já nas fases iniciais da doença (Montserrat & Moreno, 2008).

Características imunofenotípicas

As células neoplásicas de LLC-B apresentam um fenótipo característico, embora por vezes relativamente heterogéneo, associado a uma escassa actividade proliferativa.

Por morfologia a LLC-B pode ser subdividida em duas entidades: típica (LLC-B, monomórfica) e atípica (LLC-B, com uma mistura de tipos celulares), segundo a proposta classificação FAB. Com base em vários trabalhos publicados, estas duas entidades, embora relacionadas, parecem diferenciar-se em termos morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos, apresentação clínica, parâmetros prognósticos e sobrevivência. Assim, as LLC-B atípicas frequentemente expressam fenótipos aberrantes e apresentam anomalias cromossómicas, (particularmente a trissomia 12), progredindo mais rapidamente; e, regra geral, apresentam estádios clínicos mais avançados, requerendo mais cedo de tratamento e apresentando uma significativa menor sobrevivência.

Em termos fenotípicos, nas formas típicas (LLC-B típica), as células B neoplásicas CD19⁺ co expressam de forma constante CD5, CD23 e CD200, e apresentam uma reactividade débil (comparativamente aos linfócitos B maduros do SP normal) para CD20, CD22, CD79b, CD81 e Smlg, na ausência de expressão de FMC7; são positivas para CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD45RA, CD62L, CXCR5 e SmlgM, e expressam de forma relativamente intensa Cybcl2. Nas formas atípicas da doença (LLC-B atípica), este padrão fenotípico pode variar, adoptando distintos perfis (p.e. CD5⁻, CD23⁻, FMC7⁺, Smlg⁺ ou CD79b⁺).

Tanto na LLC-B típica, como nas formas atípicas, o padrão de expressão de outros marcadores como CD11c, CD38, CD45RO, CD49d, CD80, CD95, CD124, CD126, CD130 e ZAP-70 é heterogéneo e variável de uns casos para outros.

É importante ainda destacar que a reactividade para alguns destes últimos marcadores, como CD38 e Cyzap-70 (presente em quase metade dos casos), se encontrar associada com o estado mutacional dos genes IGVH – ausência de mutações somáticas – e/ou um pior prognóstico da doença. No caso do CD49d, a sua expressão nas células tumorais de LLC-B não mutadas tem sido associada também a um pior prognóstico. Estudos realizados até à data revelam que doentes com formas atípicas da LLC-B apresentam uma maior probabilidade de progredir para estádios mais avançados da doença comparativamente com aqueles com LLC-B típica.

Importa referir que o CD5 é expresso em linfócitos T normais, mas a sua expressão também é observada em várias patologias da célula B, como o linfoma do manto e na LLC-B. O papel de CD5 ainda é desconhecido mas acredita-se que nos linfócitos T esta molécula tem um papel importante na ativação celular e nos linfócitos B o CD5 contribui para a sua sobrevivência e produção da IL-10 induzindo um estado de anergia nos linfócitos. Estudos anteriores têm associado a LLC-B CD5⁺ com o desenvolvimento de doenças autoimunes (Jevremovic et al., 2010, Cavalcanti Júnior et al., 2005).

Além do mais, várias patologias da célula B apresentam uma fase leucémica e características que se sobrepõem à da LLC-B dificultando assim o seu diagnóstico. Neste sentido, surge uma necessidade de adotar novos marcadores para distinguir a LLC-B de outras patologias da célula B. Estudos recentes têm demonstrado que LLC-B é uniformemente positiva para o marcador CD200, já o Linfoma da Célula do Manto não expressa este antígeno (Palumbo et al., 2009). O marcador CD200 é uma glicoproteína membrana da família das imunoglobulinas do tipo I, está presente em muitas células, incluindo as células B, um tipo de células T, células dendríticas, células endoteliais e no sistema nervoso periférico e central. A glicoproteína CD200 desempenha um papel imunossupressor através das células T e regula a atividade das células mieloides em diversos tecidos. Através do estudo imunofenotípico verificou-se que as células de LLC-B expressam CD200 comparativamente com as células B normais. Nos casos de LLC-B a expressão de CD200 parece que diminui a resposta imune e estudos anteriores realizados em animais verificou-se que a expressão de CD200 suprime a resposta imune anti tumoral (Dorfman e Shahsafari, 2010) (Palumbo et al., 2009).

Características genéticas

À semelhança do que ocorre com as características fenotípicas, geneticamente a LLC-B é também uma doença heterogénea, detectando-se alterações cromossómicas em aproximadamente 50-80% dos doentes (Quijano et al., 2008). A alteração numérica mais frequente é a trissomia 12 (presente em 15-25% dos casos), que pode aparecer isolada ou junto com outras anomalias. Esta pode ser a primeira alteração genética secundária que, junto com outras anomalias cromossómicas, provavelmente reflete uma evolução clonal com progressão da doença; além do mais, a presença de trissomia 12 tem sido associada com uma maior frequência a LLC-B com morfologia atípica e/ou um aumento da expressão de CD19, CD22, CD20, CD79b, CD24, CD27, CD38, Smlg e/ou FMC7/CD20 e com fraca reatividade de CD43, quando comparado com casos de LLC sem alterações citogenéticas. Por sua vez, a alteração estrutural detectada com maior frequência nos doentes com LLC-B é a perda de material genético do cromossoma 13, por deleção na banda 13q14.3 presente em 35-60% dos casos, seguida de deleções no cromossoma 11 a nível da banda 11q22.3~q23.3 (5-20% dos casos) e no cromossoma 17p13 (5-16% dos casos). Nos casos com a deleção 13q14 verifica-se um aumento na expressão de CD20, CD22, FMC7, CD5, CD27 e Cybcl2, enquanto doentes com del11 apresentam maior expressão de CD38, FMC7, CD25 e slg (Quijano et al., 2008).

Importa referir que cada uma destas anomalias cromossómicas em LLC-B potencialmente resulta em alterações na função reguladora de pequenos RNAs não codificantes – micro-RNA (miRNA) – capazes de inibir a síntese proteica, quer directamente por alteração da transcrição de mRNA ou indirectamente por provocarem a sua degradação. Uma vez que os genes-alvo destes miRNAs se encontram muitas vezes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, ou angiogenese, estes podem funcionar quer como genes supressores ou oncogenes, dependendo do seu nível de expressão ou capacidades funcionais. Em LLC-B dois miRNAs (miR15a e miR16-1) são frequentemente perdidos na deleção 13q e em doentes com LLC-B familiar parece ocorrer uma mutação germinal que afecta este grupo de genes miR15/16. Assim, a deleção/inativação monoalélica ou bialélica de miR15/16 resulta num aumento da expressão de bcl2 em LLC-B e num aumento do crescimento celular e progressão no ciclo celular. Outros exemplos incluem a perda de miR34b e miR34c com a deleção de 11q e de miR34a com a deleção de 17p. Deste modo, este grupo de miR-15a/16-1, juntamente com outros como miR29a/29b e miR181a/181b, parecem funcionar como

genes supressores tumorais e a sua inactivação poderá promover a expressão de genes envolvidos na ontogenia da doença.

Menos frequentemente, alguns miRNAs (p.e. miR-21 e miR-181) podem também estar sobre regulados em LLC-B podendo desempenhar mais um papel oncogénico que anti-oncogénico.

No que se refere ao impacto prognóstico das alterações citogenéticas, merece destacar que a LLC-B com del(13q) ou cariótipo normal parece apresentar um bom prognóstico; pelo contrário, os doentes com del(11q), del(17p) ou cariótipo complexo, apresentam uma pior evolução associada a uma sobrevivência significativamente mais curta e, no caso de doentes com del(17p), a ausência de resposta ao tratamento convencional. As LLC-B com trissomia 12 apresentam um prognóstico intermédio.

Embora inicialmente se tenha descrito a presença de t(11;14) em algumas LLC-B, hoje considera-se esta alteração altamente sugestiva de LCM. De igual forma, em uma pequena proporção de LLC-B ($\leq 5\%$) se descreveu a presença da t(14;18) própria dos LF, casos nos quais se torna obrigatório fazer o diagnóstico diferencial entre ambas as entidades. Em casos isolados foi detectada a presença da t(14;19), relacionada com uma alteração posicional do gene *BCL3*.

Factores de prognóstico

A classificação convencional dos doentes com LLC-B para estadiamento da doença baseia-se numa serie de observações clínicas e análises de laboratório desde há muito estabelecidas, propostas pelos grupos de trabalho de Rai *et al* e Binet *et al* (Tabela 2). Ambos os sistemas refletem a carga tumoral global do doente e permitem estabelecer o prognóstico no momento do diagnóstico da doença (Tabela 4). Devido à sua simplicidade e reprodutibilidade, estes sistemas de classificação foram amplamente adoptados durante décadas, e o seu valor prognóstico validado em numerosos estudos. Contudo, na actualidade a informação obtida a partir da clínica do doente e da contagem das suas células sanguíneas não é suficiente para predizer a sobrevivência ou a necessidade específica de tratamento dos doentes com LLC-B, pelo menos a médio ou longo prazo.

Tabela II. Estádios clínicos da LLC-B segundo as classificações de Rai *et al* e de Binet *et al*.

	Grupo de risco	Características clínicas	Mediana de sobrevivência (meses)
<i>Estádios de Rai</i>			
0	Baixo	Só linfocitose ^a	>150
I	Intermédio	Linfocitose, linfadenopatia	101
II	Intermédio	Linfocitose, esplenomegalia e/ou	71
III	Alto	Linfocitose, anemia ^b (Hb <110g/L)	19
IV	Alto	Linfocitose, trombopenia ^c (plaquetas <100x10 ⁹ /L)	19
<i>Estádios de Binet</i>			
A	Baixo	Sem anemia, nem trombopenia;	>160
B	Intermédio	Sem anemia, nem trombopenia;	84
C	Alto	Anemia ^b (Hb <100g/L) e/ou Trombopenia ^c (plaquetas <100x10 ⁹ /L)	24

^a Contagem absoluta de linfócitos em sangue >5x10⁹/L

^b Com ou sem aumento do tamanho de ganglios linfáticos, baço ou fígado

^c Com ou sem anemia ou aumento de tamanho de ganglios linfáticos, baço ou fígado

^d Cinco áreas linfóides possíveis: axilar, cervical, inguinal, baço e fígado

Por este motivo, aos anteriores foram adicionados outros factores, entre os quais parâmetros biológicos que permitem estimar a evolução da doença de forma mais precisa (Tabela 3). No que diz respeito ao sexo, as mulheres parecem apresentar uma sobrevivência mais longa comparada com a dos homens, embora a razão exacta para esta diferença continue desconhecida; quanto à influência da idade no prognóstico, esta não está clara, porque por um lado a sobrevivência é mais longa nos jovens e mais curta nos doentes de idade mais avançada, mas por outro as mortes relacionadas com a doença ocorrem mais frequentemente em doentes mais jovens (Montserrat e Moreno, 2008).

A morfologia celular e o padrão histológico de infiltração da MO relacionam-se claramente com o prognóstico da LLC-B: uma morfologia celular atípica definida pela presença de prolinfócitos ou linfócitos clivados associa-se com um pior prognóstico da doença; por sua vez, um padrão de infiltração difuso da MO relaciona-se com uma menor sobrevivência, em comparação com os doentes nos quais se observa um padrão de infiltração medular não difuso.

Tabela III. LLC-B: Outros fatores prognósticos adicionais aos parâmetros individuais incluídos nas classificações de Rai e de Binet.

Factor Prognóstico	Risco clínico	
	BAIXO	ALTO
Principais		
<i>Sexo</i>	Femenino	Masculino
<i>Estadio clínico</i>	Binet A Rai 0, I	Binet B ou C Rai II, III, IV
<i>Padrão de infiltração da MO</i>	Padrão não difuso	Padrão difuso
<i>Morfologia dos linfócitos</i>	Típica	Atípica
<i>Tempo de duplicação linfocitária</i>	>12 meses	<12 meses
<i>Expressão de CD38 (% células positivas)</i>	<20-30%	>20-30%
<i>Alterações genéticas</i>	Nenhuma del(13q) insolada	del(11q) Perda/mutação TP53
<i>Nível sérico de timidina kinase</i>	Baixo (< 7,1UI/L)	Alto (> 7,1UI/L)
<i>Estado dos genes IGVH</i>	Mutado	Não mutado
<i>Expressão de ZAP-70</i>	Baixa	Alta
Outros		
<i>Nível de β2-microglobulina no plasma</i>	Baixo (< 2,5 mg/L)	Alto (> 2,5 mg/L)
<i>Nível de CD23 solúvel no plasma</i>	Baixo (< 574 U/mL)	Alto (>574 U/mL)

MO: medula óssea

Os restantes factores prognósticos são fundamentalmente parâmetros biológicos, na maioria dos quais já foi feita referência nas secções anteriores desta tese; destes (Tabela 3), se destaca a expressão de CD38 e zap-70. O CD38 é uma glicoproteína que têm um papel complexo na proliferação dos linfócitos, a ligação desta proteína em linfócitos B maduros protege-os da apoptose e aumenta a expressão do Bcl-2, enquanto nas células B imaturas suprime o seu crescimento na medula óssea (Matutes, 2002, Ibrahim, 2001). A proteína ZAP-70 (*Protein Zeta-associated*) é uma proteína da família tirosina quinase (PTK), normalmente expressa nos linfócitos T e NK, desempenha um papel fundamental na ativação dos linfócitos T através do recetor da célula T (TCR). Após a interação do ZAP-70 com o complexo TCR/CD3 ocorre a ativação da cascata de sinalização dos linfócitos T (Vroblova., et al 2012). As células B normalmente não expressam ZAP-70 utilizam outra proteína da família tirosina quinase, a Syk (*Spleen Tyrosine Kinase*), para a ativação do linfócito B através da interação com o BCR (Vroblova., et al 2012). As proteínas ZAP-70 e Syk apresentam papéis semelhantes na sinalização do recetor de membrana das células.

Sendo assim a expressão de ZAP-70 nos indivíduos com LLC-B está associada com o aumento da sinalização do BCR e assim poderá estar associado ao estado mais agressivo da doença (Chen et al., 2002).

Em suma um conjunto de parâmetros biológicos relacionam-se com um pior prognóstico (curso clínico mais agressivo e uma menor sobrevivência): a ausência de mutações somáticas nos genes IGVH, o aumento na expressão de Czap-70 e de CD38 nos linfócitos B neoplásicos e as deleções e/ou mutações que envolvem os genes *TP53* e/ou *ATM* (Ibrahim, 2001, Ghia et al., 2003). A importância clínica do estudo combinado das mutações de IGVH e da expressão de CD38 e zap-70 foi comprovado em diversos trabalhos (Montserrat e Moreno, 2008, Hsi, 2012). No entanto, a maioria dos autores está de acordo em que antes de serem incorporados de forma definitiva ao processo de tomada de decisões terapêuticas na prática clínica, deve fazer-se um esforço de standardização e de validação em ensaios clínicos prospectivos que incluam series numerosas de doentes, tendo ainda em conta que devem ser factores prognósticos independentes, e que permitam fazer uma avaliação prognóstica dos doentes com LLC-B de forma simples e reproduzível.

3. Linfocitose Monoclonal de Linfócitos B (LMB)

A linfocitose monoclonal de linfócitos B (LMB) é uma entidade caracterizada pela presença de pequenas populações de linfócitos B monoclonais ($< 5 \times 10^9/L$) circulantes no SP de adultos saudáveis – na ausência de LLC-B ou outro SLPC-B, processo infeccioso ou doença autoimune. Constitui uma categoria diagnóstica de descrição relativamente recente, incluída pelo Grupo de Trabalho do Instituto Nacional do Cancro/*Workshop* Internacional de LLC-B (NCI-WG/IWCLL) na última revisão das directrizes de diagnóstico e tratamento da LLC-B; seu significado clínico é até ao momento desconhecido (Montserrat e Moreno, 2008).

A relação existente entre a LMB e a LLC-B ou outros SLPC-B tem sido uma área de investigação intensa ao longo da última década. No momento actual parece claro, pelos resultados obtidos a partir de estudos populacionais, que a LMB é um estágio que precede praticamente sempre a LLC-B, depois de um período de "latência" de vários anos; no entanto, aparentemente a maioria das LMB têm uma capacidade limitada de evolucionar a LLC-B, de forma que a taxa de progressão anual a LLC-B ou outro SLPC-B com manifestação clínica situa-se em cerca de 1%. Além do mais, em trabalhos recentes foi descrita uma elevada prevalência de casos de LMB em indivíduos com história familiar de LLC-B e contagens sanguíneas normais (prevalência de 13,5-18%).

Em resumo, a sensibilidade progressivamente mais elevada da Citometria de fluxo veio permitir a identificação de pequenos clones linfóides B circulantes em sujeitos sem evidência de doença, incluso na ausência de linfocitose B. Tal gerou um problema diagnóstico, já que estes casos não podiam ser classificados como LLC-B, mas também seria inapropriado considera-los como equivalentes a indivíduos completamente normais; assim surge por consenso internacional o termo de "**Linfocitose B monoclonal**" de forma a identifica-los e diferencia-los da LLC-B e de outros SLPC-B.

Tratamento

O tratamento está indicado apenas quando qualquer uma das seguintes características está presente:

- Febre sem evidência de infecção, fadiga extrema, suores noturnos e perda de peso;
- Aumento de anemia ou trombocitopenia devido à falência da medula óssea.
- Linfadenopatia progressiva ou volumosa; Esplenomegalia maciça ou progressiva.
- Citopenias auto imunes sem resposta à terapêutica de corticosteroides.
- Aumento rápido da contagem de linfócitos no sangue periférico (em menos de 6 meses os linfócitos aumentam para o dobro).

O tratamento de pacientes num estágio de baixo risco (Binet A e Rai 0) tem resultado num atraso na progressão da doença mas não se verifica aumento da esperança média de vida. Estudos apontam que os pacientes num estágio de baixo risco mas com marcadores desfavoráveis (por exemplo aumento da expressão de ZAP-70, aumento nos níveis séricos de timidina quinase, duplicação rápida do número de linfócitos, alterações genéticas) se detetados cedo podem beneficiar do tratamento. Os pacientes num estágio intermédio (Rai I e II; Binet B) apresentam um decurso indolente da doença, nestes casos não se inicia a terapêutica tal como no estágio de baixo risco. No entanto a maioria dos pacientes que se encontram no estágio intermédio da doença e todos os pacientes no estágio avançado (Rai III e IV) requerem terapêutica devido á infiltração que ocorre na medula óssea.

O Chlorambucil tem sido o medicamento de escolha, mas também são utilizados purinas análogos (fludarabina), a ciclofosfamida e rituximab. Outro tratamento é o transplante autólogo mas uma condição necessária para o sucesso é uma resposta completa ao tratamento antes do transplante, no entanto, é muito improvável em pacientes refratários com regimes de quimioterapia ou imunoterapia. Além disso, fatores de prognóstico desfavoráveis como a del(17p), del(11q) e os genes da IgVH não mutados predispoem piores resultados aos tratamentos de quimioterapia antes do transplante autólogo.

Os transplantes autólogos prolongam o tempo de vida dos indivíduos com LLC-B mas não curam a patologia, no entanto isto só se verifica em pacientes que não apresentam fatores de prognóstico desfavoráveis, que são transplantados no início do desenvolvimento da patologia e que sejam sensíveis aos tratamentos de quimioterapia. O problema que pode ocorrer após os autotransplantes é o risco dos pacientes desenvolverem mielodisplasias secundárias e leucemia mieloide aguda, particularmente em pacientes que fazem tratamentos de radioterapia no corpo todo. No entanto os transplantes alogénicos podem curar cerca de 40% dos indivíduos, mas á custa de uma elevada toxicidade e mortalidade. Devido a este facto e ao avanço da idade da maioria dos pacientes com LLC-B, são aplicados tratamentos de reduzida intensidade aos pacientes que requerem transplante (Montserrat & Moreno, 2008).

II- Objetivos do trabalho

- Quantificar e caracterizar fenotipicamente as células B normais da medula óssea nos diferentes compartimentos maturativos (CD34+, hematogónias, maduras e plasmócitos) de doentes diagnosticados com LLC-B (sem tratamento) e em medulas ósseas normais/reativas.
- Relacionar estes resultados com a presença das diferentes alterações genéticas mais frequentes em LLC-B.

III- Material e Métodos

População de estudo

Pacientes

Foram estudados 44 pacientes com LLC- B diagnosticados no Hospital Universitário de Coimbra (HUC), dos quais 30 pacientes do sexo masculino com média de idade de 68 ± 10 anos e 14 pacientes do sexo feminino com média de idade de 70 ± 10 anos.

Dos 44 pacientes 28 foram submetidos ao estudo das alterações genéticas por FISH mais frequentes em LLC-B, dos quais 9 tinham a del13, 6 a Trissomia 12, 5 o rearranjo (14q32) e em 9 não se detetaram nenhuma alteração genética.

Grupo Controlo

Neste estudo foi incluído um grupo controlo de 10 indivíduos com medulas ósseas normais ou reativas, dos quais 5 indivíduos do sexo masculino com média de idade de 70 ± 10 anos e 5 indivíduos do sexo feminino com média de idade de 60 ± 10 anos.

Amostras

Os aspirados de medula óssea dos pacientes e do grupo controlo foram colhidos para tubos com o anticoagulante de EDTA (Ácido etileno-diamino-tetra-acético). As amostras foram devidamente identificadas e enviadas para o laboratório, juntamente com a informação clínica.

Ética

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comité da Ética do CHC e HUC, todos os participantes leram e assinaram o consentimento informado, respeitando todos os princípios da Declaração de Helsínquia.

3.1 Análise fenotípica das células B por Citometria de Fluxo

Para a análise fenotípica das células B adicionou-se 100µl de amostra dos aspirados das medulas ósseas em cada um dos tubos e juntou-se os anticorpos monoclonais para a identificação dos antígenos de membrana (ver Tabela IV e V).

Tabela IV: Características dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação das células no Tubo Screening para Doenças Linfoproliferativas T, B e NK.

Tubo Screening para Doenças Linfoproliferativas T, B e NK			
Anticorpo Monoclonal	Clone	Fluorocromo	Marca
Anti- CD20	2H7	Pacific Blue	Biolegend
Anti- CD8 + Igλ	-	FITC Isotiocianato de Fluoresceína	Cytognos
Anti- CD56 + Igκ	-	PE Ficoeritrina	Cytognos
Anti-CD19	cl3-119	PC7 Ficoeritrina cianina7	Beckman Coulter
Anti-CD45	HI30	Pacific Orange	Invitrogen
Anti-CD38	HIT2	APC-H7 Aloficocianina H7	BC Biosciences
Anti-CD3	SK7	APC Aloficocianina	BC Biosciences
Anti-CD5	L17F12	Percy-Cy 5,5 Proteína peridina- clorofila cianina 5.5	BC Biosciences

Tabela V: Caraterísticas dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação das células no Tubo para o diagnóstico de LLC-B.

Tubo para diagnóstico de LLC-B			
Anticorpo Monoclonal	Clone	Fluorocromo	Marca
Anti- CD20	2H7	Pacific Blue	Biolegend
Anti- CD200	OX104	APC Alofococianina	eBioscience
Anti-CD23	MHM6	FITC Isotiocianato de Fluoresceína	Dako
Anti-CD43	1G10	APC-H7 Alofococianina H7	BC Biosciences
Anti-CD79b	CB3-1	Percy-Cy 5,5 Proteína peridina- clorofila cianina5.5	BC Biosciences
Anti-CD10	ALB1	PE Ficoeritrina	Beckman Coulter
Anti-CD45	HI30	Pacific Orange	Invitrogen

Agitou-se os tubos no vórtex e incubou-se 10 minutos no escuro. De seguida, adicionou-se 2 ml de FACS Lysing Solution diluído a 1:10 e voltou-se a incubar mais 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Centrifugou-se os tubos durante 5 minutos a 1500 r.p.m. (rotações por minuto) e decantou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 1,5ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) aos tubos, agitou-se no vórtex e centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 1500 r.p.m. Suspendeu-se novamente em 250 µl de PBS e adquiriu-se a amostra no citometro de fluxo.

As amostras foram adquiridas no citometro de fluxo FACS-Canto II (BDB, San José, Califórnia, EUA) com recurso ao sistema informático FACSDiva (BDB, San José, Califórnia, EUA). A análise dos dados obtidos no citometro de fluxo foi efetuada através do programa Infinicyt 1.5 (Cytognos, Salamanca, Espanha). As células B patológicas foram identificadas com base na expressão de CD5 e/ou pela expressão clonal das cadeias leves das imunoglobulinas *kappa* ou *lambda*.

Posteriormente, identificaram-se as células B normais após a exclusão das células patológicas. Os diferentes compartimentos das células B, células imaturas (CD34+), hematogónias, células maduras e células plasmáticas foram identificadas e caracterizadas através da expressão de CD19, CD20, CD38, CD10, CD23, CD79b, CD200, CD5, CD43 e da expressão das cadeias leves *Kappa* e *Lambda*.

3.2 Isolamento das células B por *cell sorting*

Para separar as células B as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, de seguida, foi retirado o pellet para um tubo de 15 ml. Efetuou-se a lise dos glóbulos vermelhos enchendo o tubo com NH₄CL (Cloreto de amónia), agitou-se e incubou-se o tubo à temperatura ambiente durante 20 minutos. Centrifugou-se novamente o tubo a 1500 rpm durante 5 minutos, decantou-se e adicionou 0,2 ml de PBS. Adicionou-se os anticorpos monoclonais a cada tubo e agitou-se no vórtex. Incubaram-se os tubos 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Centrifugaram-se novamente a 1500rpm durante 5 minutos, decantou-se e adicionou-se 2 ml de PBS. Agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 minutos. Decantou-se as amostras e suspendeu-se em 0,5 ml de PBS. Procedeu-se à análise da amostra no FACS ARIA para a separação das células B.

3.3 Análise das alterações genéticas

A análise das alterações genéticas mais frequentes em LLC-B, del13q, trissomia do cromossoma 12 e o rearranjo do gene IgH, foi realizada pela técnica de FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*) nas células B patológicas separadas e purificadas por *cell sorting*. Para este estudo foram utilizadas as seguintes sondas de DNA: CEP12 DNA sonda conjugada com *spectrum orange* (SO), LSI ATM (11q22.3), LSI p53 conjugada com SO, LSI 13/RB1 conjugada com *spectrum Green* SG e LSI D13S25 (13q14.3) conjugada com SO. As células B separadas por *cell sorting* foram conservas em solução de Carnoy (metanol e ácido acético 1:3) e após aplicadas nas lâminas de vidro forma sujeitas a um tratamento enzimático com pepsina a 0.005% durante 15 minutos a 37°C. De seguida, foram lavadas duas vezes em PBS e posteriormente fixadas formaldeído a 1% com cloreto do magnésio durante 10 minutos.

Foram de seguidas lavadas mais duas vezes em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente e por fim desidratadas em etanol a 70%, 90% e 100%. De seguida promoveu-se a desnaturação do DNA das células de interesse e das sondas específicas a 82°C durante 10 minutos e a hibridização ocorreu a 38°C *overnight* no termohibridizador ThermoBrite da Abbott. A lavagem pós-hibridização, ao abrigo da luz, foi realizada em formamida a 50% durante 5 minutos a 46°C. De seguida, lavou-se duas vezes em SSC (Citrato de cloreto de sódio) com o pH de 7 durante 2 minutos a 46°C. Posteriormente, fez-se a contra-coloração, aplicou-se a solução contraste DAPI durante 2 minutos à temperatura ambiente. Colocou-se 10µl de Vectashield e cobriu-se com uma lamela 24x50 e guardou-se a -20°C. A leitura foi feita num microscópio de fluorescência Nikon.

3.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste não paramétrico Mann-Whitney U para amostras independentes. As diferenças estatísticas encontradas entre os grupos em estudo foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p \leq 0.05$. A análise estatística foi efetuada com recurso ao *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 17.0 (IBM, Armonk, NY, EUA).

IV- Resultados

4.1 - Frequência de células B nos diferentes compartimentos maturativos.

Procedeu-se à determinação da percentagem de células B em cada compartimento maturativo: células imaturas CD34+, hematogónias, maduras e células plasmáticas. Para obter estes resultados sem que ocorressem diferenças percentuais devido à presença de células B malignas nas amostras de LLC-B, as células B normais foram quantificadas na ausência das células malignas, para desta forma se poder comparar com os resultados obtidos nas medulas ósseas normais/reactivas.

Verificou-se uma diminuição na percentagem de células B maduras e de plasmócitos nos indivíduos com LLC-B quando comparado com o grupo controlo. Embora, sem se obter resultados estatisticamente significativos observou-se um aumento de células imaturas e hematogónias nos indivíduos com LLC-B quando comparado com o grupo controlo, como se pode ver na tabela VI.

Tabela VI: Percentagem, dada pela média \pm desvio padrão, das células B nos diferentes compartimentos maturativos no grupo de LLC-B e no Grupo controlo. Significado estatístico quando $p < 0,05$.

Células	Grupo	Média\pm Desvio padrão
Células Imaturas	LLC-B	25,7 \pm 18,12
	Controlo	19,05 \pm 22,89
Hematogónias	LLC-B	23,06 \pm 20,21
	Controlo	14,57 \pm 18,35
Células Maduras	LLC-B	51,26 \pm 26,99
	Controlo	71,78 \pm 22,88
Células Plasmáticas	LLC-B	0,14 \pm 0,15
	Controlo	0,28 \pm 0,13

4.2- Caracterização fenotípica das células B normais nos diferentes compartimentos maturativos.

Neste estudo avaliou-se a expressão de CD38, CD10 e CD43 nas células B imaturas CD34⁺, nas hematogónias estudou-se o CD43 e CD10; o CD23, CD200, CD79b nas células B maduras e o CD38, CD43 e o CD200 nas células plasmáticas.

Observou-se, no grupo LLC-B, uma diminuição da expressão para todos os recetores estudados nas células B imaturas CD34⁺ e nas hematogónias. Pelo contrário, observou-se um aumento da expressão de CD79b nas células B maduras e de CD200 nos plasmócitos. Nestes últimos também se verificou uma diminuição da expressão de CD38 e de CD43. (Ver figura 4)

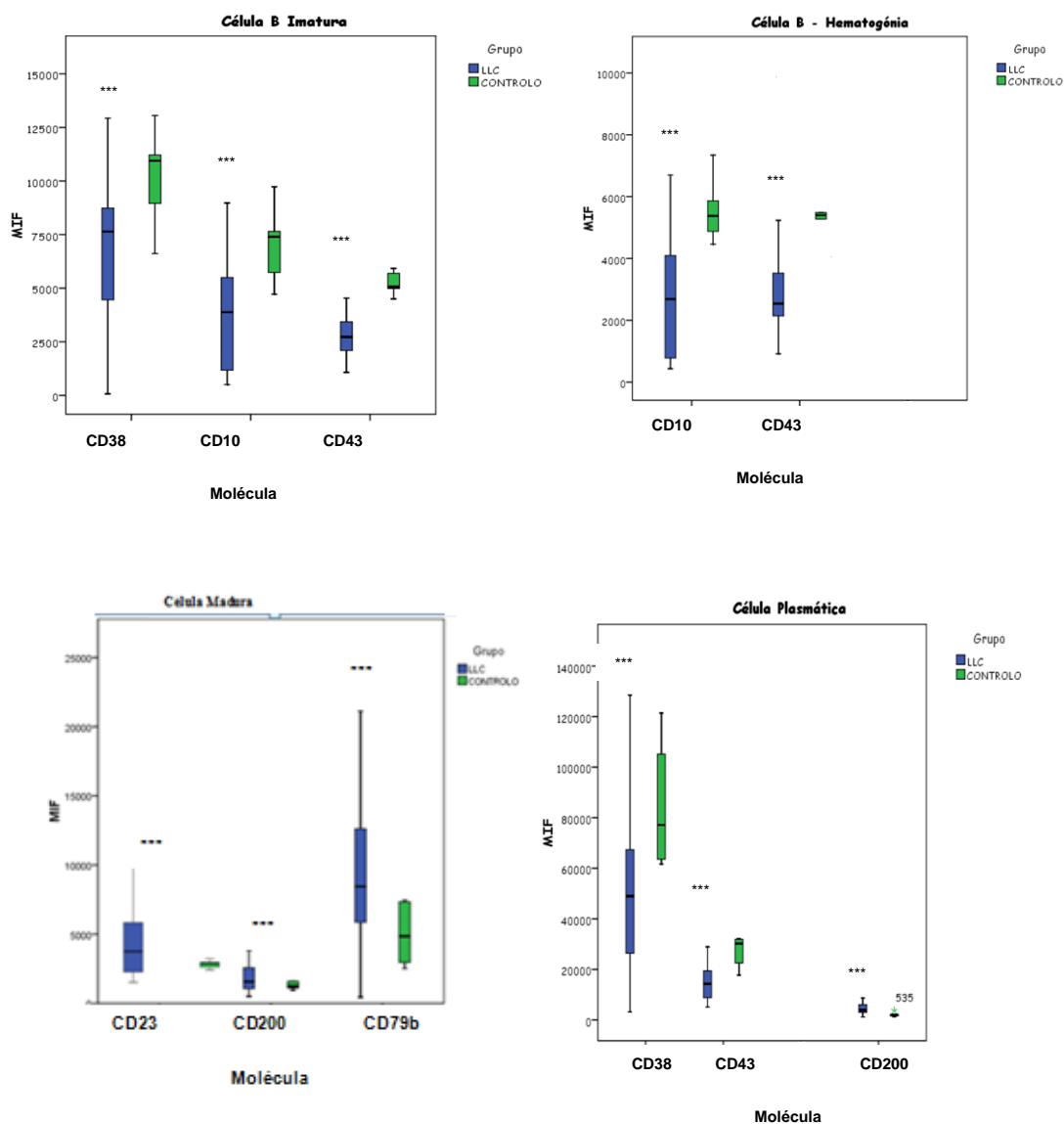


Figura 4: Expressão, dada pela média de intensidade de fluorescência para as moléculas estudadas nos diferentes compartimentos maturativos das células B no grupo de LLC-B e no grupo controlo. *** Significado estatístico quando $p < 0,05$.

4.3 - Frequência de células B em cada estágio maturativo/expressão dos diferentes recetores estudados e sua relação com as alterações genéticas detetadas por FISH

De forma a atingir o segundo objetivo desta tese, fomos verificar se ocorriam alterações quantitativas e qualitativas nas células B nos diferentes estádios maturativos em função da presença de alterações genéticas frequentes em LLC-B, del(13q14.3) mono-alélica, trissomia 12 e o rearranjo (14q32).

4.3.1 Células B imaturas CD34⁺.

Como já se tinha verificado anteriormente, observou-se um maior número de células imaturas no grupo de LLC-B comparativamente com o grupo controlo, embora sem atingir significado estatístico. Verificou-se que ocorre um maior número de células imaturas no grupo de LLC-B na presença do rearranjo (14q32) quando comparado com as outras alterações genéticas, como se pode ver na figura 5.

Frequência de Células Imaturas CD34⁺

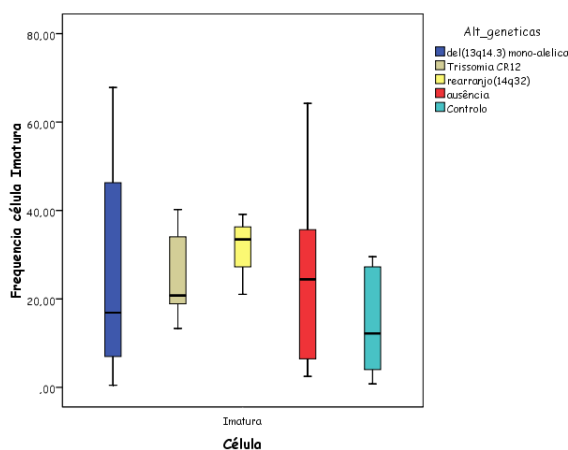


Figura 5: Frequência das células B imaturas CD34⁺ em função das alterações genéticas estudadas no grupo LLC-B, nos indivíduos com LLC-B sem alterações genéticas e no grupo controlo.

De uma maneira geral observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de CD43, CD10 e de CD38 nas células B imaturas CD34+ no grupo de LLC-B, com e sem a presença das diferentes alterações genéticas, com exceção do CD38, na presença de rearranjo (14q32), cuja expressão é similar à observada no grupo controlo, como se pode observar na figura 6.

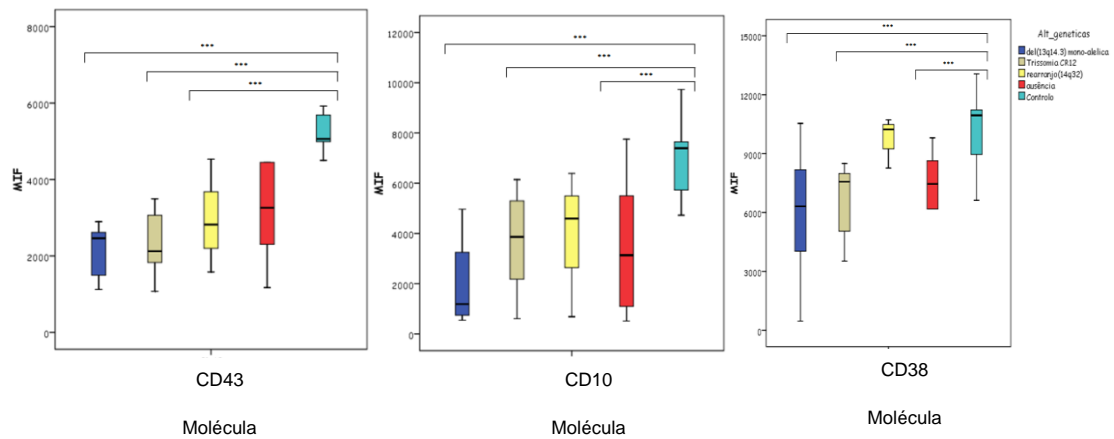


Figura 6: Expressão das moléculas CD43, CD10 e CD38 dada pela média de intensidade de flurencência nas células B imaturas CD34+ para as diferentes alterações genéticas no grupo LLC-B, no grupo de LLC-B sem alterações genéticas e no Grupo Controlo. *** Significado estatístico quando $p < 0,05$.

4.3.2 Hematogónias

Relativamente às células hematogónias, verificou-se um aumento da sua frequência na presença do rearranjo (14q32) quando comparado com os outros grupos de LLC-B e com o grupo controlo, embora sem se atingir significado estatístico. (Ver figura 7)

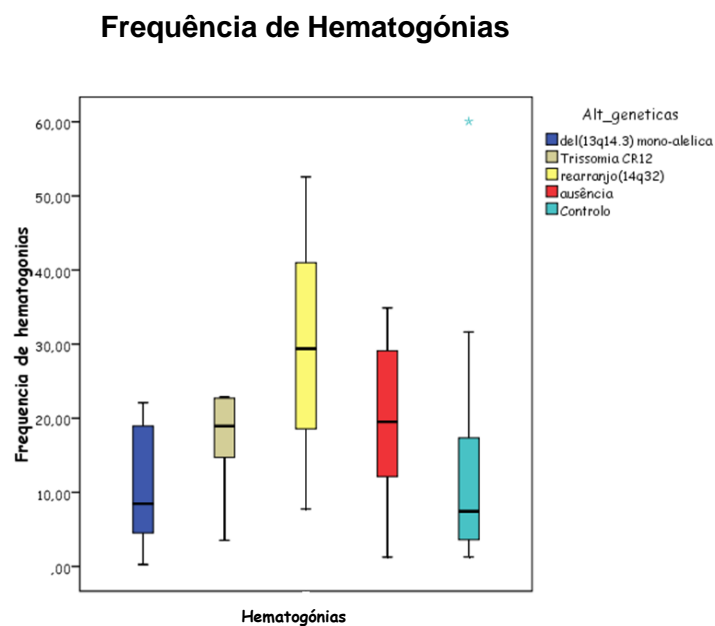


Figura 7: Frequência das células hematogónias em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.

Relativamente à expressão das moléculas CD43 e CD10, observou-se uma diminuição desta em todos os subgrupos de LLC-B com base na presença ou ausência das alterações genéticas estudadas, quando comparado com o grupo controlo, no entanto, não se detetaram diferenças entre os diferentes grupos com as diferentes alterações genéticas, como se pode observar na figura 8.

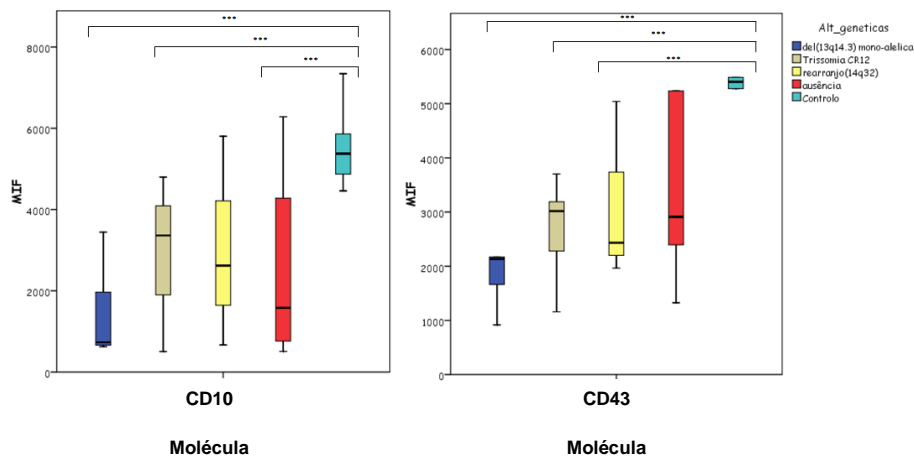


Figura 8: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD10 e CD43 nas células hematogónias em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo. *** Significado estatístico quando $p < 0,05$.

4.3.3 Células maduras

Relativamente às células maduras e como já tínhamos verificado anteriormente, ocorre uma diminuição da frequência de células B maduras no grupo de LLC-B, quando comparado com o grupo controlo, independentemente da presença de uma alteração genética específica ou da ausência destas. (Ver figura 9)

Frequência de Células maduras

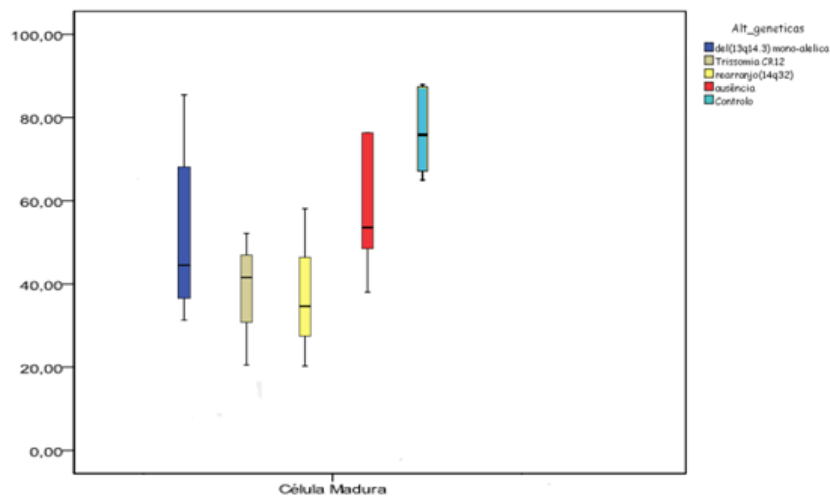


Figura 9: Frequência das células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.

Não se observaram diferenças significativas na expressão de CD23 e de CD200 nestas células nos diferentes grupos estudados. Relativamente à molécula CD79b, e como anteriormente descrito, tinha-se verificado aumento desta expressão no grupo LLC-B. Quando se subdividiu este grupo com base na presença de alterações genéticas específicas, parece haver uma tendência para esta expressão ser maior na presença do rearranjo (14q32) como se pode observar na figura 10.

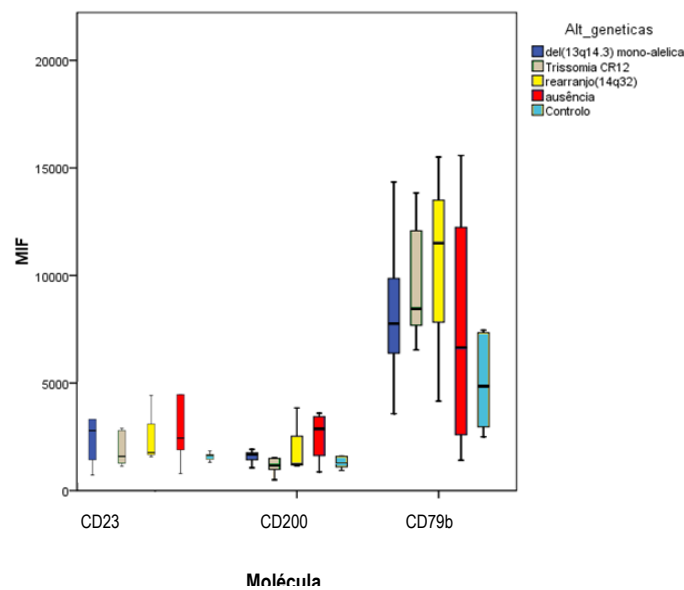


Figura 10: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD23, CD200 e CD79b nas células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo.

4.4.4 Plasmócitos

Nas células plasmáticas, e como já se tinha verificado anteriormente verificou-se que o grupo de LLC-B apresenta uma menor frequência de células plasmáticas quando comparado com o grupo controlo. No entanto, não se observam diferenças entre os diferentes subgrupos de LLC-B. (Ver figura 11)

Frequência de Células Plasmáticas

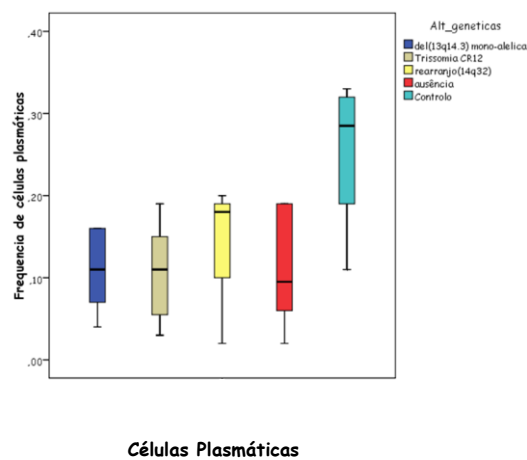


Figura 11: Frequência das células plasmáticas em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no grupo controlo.

Relativamente à expressão de CD43 e de CD38 continua a observar-se uma diminuição da expressão destas duas moléculas nos diferentes subgrupos de LLC-B e independente da presença ou ausência de alterações genéticas.

Já para a expressão da molécula CD200 verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de LLC-B com Trissomia 12 e o rearranjo (14q32) e o grupo LLC-B sem alterações genéticas, sendo a expressão de CD200 nesse grupo mais próxima da observada no grupo controlo, como se pode observar na figura 12.

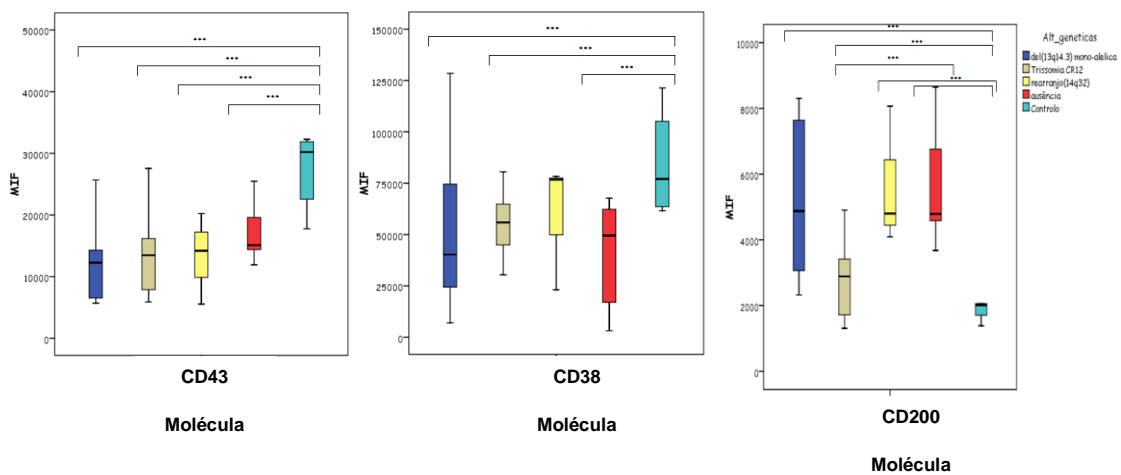


Figura 12: Expressão dada pela média de intensidade de flurencência para as moléculas CD43, CD38 e CD200 nas células maduras em função das alterações genéticas estudadas no grupo de LLC-B, nos indivíduos sem alterações genéticas e no Grupo Controlo. *** Significado estatístico quando $p < 0,05$.

V- Discussão

Com a realização deste trabalho pretendeu-se quantificar as células B normais da medula óssea nos seus diferentes compartimentos maturativos, células imaturas CD34+, hematogónias, maduras e células plasmáticas e caracterizar fenotipicamente cada subpopulação, em doentes com LLC-B e nas medulas ósseas normais/reactivas. Também se comparou as alterações numéricas e fenotípicas das células B normais com a presença de alterações genéticas típicas de LLC-B.

Para a quantificação das diferentes subpopulações de células B dentro da totalidade das células B da medula óssea foram retiradas, no grupo LLC-B, as células B clonais. Para as células plasmáticas, a sua frequência na celularidade total da medula óssea foi determinada após remoção das células B clonais de LLC-B.

Estudos anteriores, sobre a hematopoiese normal na medula óssea revelaram que a população maioritária são as células maduras (Lochem, E.G., 2004) como se verificou neste estudo no grupo controlo e nos casos das células normais de LLC-B. O número de células B nos diferentes estádios maturativos foram aumentando desde o mais imaturo para o mais maduro, indicando que a diferenciação destas células acompanha a proliferação das mesmas (Ciudad,J.,1998).

Verificou-se uma diminuição da percentagem de células normais maduras e de células plasmáticas nos indivíduos com LLC-B quando comparado com o grupo controlo. Já para as células imaturas e hematogónias observou-se um aumento destas nos indivíduos com LLC-B quando comparado com o grupo controlo, embora, sem se obter resultados estatisticamente significativos. Este facto pode ser devido à expansão desregulada das células B malignas impedindo assim a diferenciação normal das células B não malignas. Estudos anteriores, revelam que há uma tendência para a diminuição de células B normais nos estádios mais avançados de LLC-B (Pluta, A., 1990).

A relação entre o número de células normais e patológicas mostrou ter valor no prognóstico noutras patologias, como é o caso do mieloma múltiplo, que revelaram que a presença de mais de 5% de células plasmáticas normais residuais na medula óssea está associado a baixo risco da progressão da doença, a características da patologia com um prognóstico mais favorável e que poderiam beneficiar de terapêuticas específicas (Paiva et al., 2009). Durante o processo de maturação das células B ocorrem sucessivas alterações ao nível da expressão das moléculas. Neste trabalho foram estudados vários

marcadores nos diferentes compartimentos maturativos, uma das moléculas foi o CD38, que é uma glicoproteína expressa em vários estádios da maturação normal da célula B, nomeadamente nos precursores da célula B, nas células presentes no centro folicular e nas células plasmáticas. A molécula CD38 pertence à família das proteínas envolvidas na produção de compostos de mobilização de cálcio, atua nos leucócitos como recetor de adesão e está presente nas vias de sinalização (Matutes, 2002).

A função de CD38 nas células B ainda não foi bem estabelecida, a sua expressão pode levar à apoptose ou proliferação, dependendo do estágio de maturação, dos estímulos naturais, da densidade da sua expressão e da presença de co fatores (Sargent, Craig, e Swerdlow, 2009), (Ibrahim, 2001). A presença da molécula CD38 nas células B maduras protege estas células da apoptose e regula a expressão do proto oncogene Bcl-2, ao contrário nas células B imaturas a molécula CD38 impede o seu crescimento (Ibrahim, 2001).

A expressão de CD38 tem sido um marcador útil no prognóstico de LLC-B, pois a sua elevada expressão está associada a estádios da patologia mais avançados, a uma fraca resposta ao tratamento e a uma taxa de sobrevivência mais curta (Matutes, 2002) (Ghia et al., 2003).

Neste estudo a expressão da molécula CD38 foi analisada nas células imaturas CD34+ e nas células plasmáticas, em ambas a expressão encontra-se mais baixa que no grupo controlo. Nas células imaturas a função do CD38 é impedir o seu crescimento, como a expressão desta molécula está mais baixa nas células normais de LLC-B que no grupo controlo, pode-se assim explicar um maior número destas células no grupo de LLC-B. Já nas células maduras a função de CD38 é impedir a apoptose, como a expressão desta molécula está mais baixa nas células normais de LLC-B que no grupo controlo, ocorrerá assim uma maior taxa de morte celular daí se verificar um menor número de células B normais em LLC-B que no grupo controlo.

A molécula CD10 é uma proteína membrana tipo II, expressa em várias células de diferentes tecidos, na hematopoiese encontra-se nas células T imaturas e maduras, nas células B e nos granulócitos. A sua função ainda é desconhecida, no entanto, tem-se estabelecido uma correlação entre a expressão de CD10 em estádios específicos e apoptose, pois observou-se o aumento de células CD10⁺ em paralelo com a presença de células apoptóticas (Morabito, F., 2003) (Zapata et al., 2010). A expressão de CD10 tem

sido utilizada como marcador para o diagnóstico de linfomas de células B do centro germinativo, como o linfoma folicular e de Burkitt. A expressão aberrante de CD10 tem sido observada em várias patologias como a leucemia das cell hairy, leucemia linfocítica crônica-B, linfoma linfoblástico, linfoma da zona marginal e linfoma B das células do manto (Zapata et al., 2010).

A expressão da molécula CD10 foi analisada nas hematogônias, verificou-se que a sua expressão está mais baixa nas células B normais de LLC-B que no grupo controle, podendo assim explicar o maior número destas células no grupo de LLC-B uma vez que esta molécula está associada a processos apoptóticos.

A molécula CD43 é uma sialoglicoproteína expressa na superfície das células B imaturas, tendo como função a adesão celular e a regular a proliferação das células B durante o seu processo de maturação na medula óssea (Tsao e Colovai, 2005) (Misawa., Y, 1996). Pacientes com LLC-B e com expressão de CD43 têm uma tendência para a acumulação das células B na medula óssea do que no sangue periférico (Rolinski et al., 1999).

A expressão da molécula CD43 foi estudada nas células imaturas e nas hematogônias verificando-se que a sua expressão está mais baixa nas células normais do grupo LLC-B quando comparada com o grupo controle. A função da molécula de CD43 é importante para o desenvolvimento normal das células B na medula óssea, podendo no grupo de LLC-B uma menor regulação da proliferação das células B mais imaturas, levando ao aumento da sua frequência.

A molécula CD200 é uma glicoproteína membranar da família das imunoglobulinas do tipo I, expressa em várias células, como as células B, T, células dendríticas, endoteliais e células do sistema nervoso periférico e central. A molécula CD200 interage com o recetor CD200R expresso principalmente na linhagem das células mieloides e dos monócitos, tendo um efeito supressor na resposta imune mediada pelas células T (Dorfman e Shahsafaei, 2010). A expressão desta molécula encontra-se mais elevada nas células B patológicas em LLC-B quando comparado com as células B normais. No modelo animal de LLC-B a expressão de CD200 nas células neoplásicas diminui a resposta imune das células Th 1 e suprime a resposta imune anti tumoral (Dorfman e Shahsafaei, 2010).

Estudos anteriores verificaram que as células plasmáticas na medula óssea normal não expressam a molécula CD200 (Manuscript, Usefulness, e Myeloma, 2013).

Neste estudo a expressão da molécula CD200 foi estudada nas células B maduras e nas células plasmáticas, verificou-se nestas células um aumento da expressão de CD200 no grupo LLC-B quando comparado com o grupo controlo, ou seja, confirmou-se a ausência da expressão de CD200 nas células plasmáticas de medulas ósseas normais e o aumento desta molécula nas células B residuais, provavelmente deve ter ocorrido uma modificação durante a fase de desenvolvimento da célula B dos pacientes com LLC-B, pois as células patológicas expressam CD200.

A molécula de CD79b faz parte do complexo BCR, formando um heterodímero com a molécula CD79a que se associa de forma não covalente com a imunoglobulina membranar da célula B, a sua função é permitir a transdução de sinal. Estudos anteriores, tem demonstrado que a expressão de CD79b encontra-se diminuída nas células B clonais de LLC-B quando comparado com outros SLPC-B. A razão para a diminuição desta molécula tem sido objeto de estudo, que sugerem que podem ocorrer mutações somáticas nos domínios citoplasmáticos e membranar do gene CD79b. (Schlette, Medeiros, Keating, & Lai, 2001). (Mccarron, Hammel, & Hsi, 2000).

A expressão da molécula CD79b foi estudada nas células maduras e verificou-se que a sua expressão está aumentada nas células B maduras normais no grupo LLC-B quando comparado com o grupo controlo, este facto poderá explicar um complexo BCR mais funcional nas células normais de LLC-B.

Outra molécula estudada foi o CD23, que é uma glicoproteína transmembranar expressa em várias células hematopoiéticas. Funciona como recetor de baixa afinidade para a IgE e promove a sobrevivência das células B no centro germinativo.

O papel de CD23 nas células B clonais na LLC-B ainda não está bem estabelecido, mas estudos recentes demonstraram que a expressão de CD23 está associada a um bom prognóstico (Diraimondo et al., 2002). Neste estudo não se verificaram diferenças significativas na expressão desta molécula entre os dois grupos estudados.

Estudos anteriores mostraram que existe uma correlação entre as alterações genéticas em LLC-B e os padrões imunofenotípicos (Quijano et al., 2008), neste estudo também se verificou alterações quantitativas e fenotípicas relacionadas com alterações genéticas mais frequentes em LLC-B, tais como, a del(13q14.3) mono-alélica, trissomia do cromossoma 12, e o rearranjo (14q32). As células de LLC-B apresentam várias alterações genéticas, no entanto, não se podem considerar alterações específicas desta doença. Cerca de 50% dos casos de LLC-B apresentam a deleção do braço longo do cromossoma 13 (13q14.3), aparentemente nesta região ocorre o controlo dos genes anti-apoptóticos das células de LLC-B. A trissomia do cromossoma 12 ocorre entre 10 a 20% dos casos, a deleção das bandas 11q22-q23, onde se encontra o gene supressor tumoral também apresenta uma taxa de incidência de 10 a 20%. As deleções nas bandas 17p13 onde está presente, outro gene supressor tumoral, o p53, é menos frequente e ocorre em cerca de 10% das LLC-B. A alteração genética mais frequente, a 13q14.3 está associada a um prognóstico mais favorável enquanto que as outras alterações genéticas apresentam pior prognóstico (Ghia, 2007).

Estudos anteriores verificaram uma correlação entre as alterações genéticas de LLC-B e os padrões imunofenotípicos, em que a presença da trissomia 12 está associada a alta expressão das moléculas de CD19, CD22, CD20, CD79b, CD24, CD27, CD38 e slg e fraca expressão da molécula CD43, quando comparado com casos de LLC-B sem alterações genéticas. Nos casos da deleção 13q verificou-se alta expressão de CD20, CD22, FMC7, CD5, CD27 e Cybcl2 já nos casos da deleção 11q verificou-se alta expressão de CD38, FMC7, CD25 e slg. A alta expressão de CD38 observou-se nos casos de trissomia 12 e del11q sendo os casos com anormalidades genéticas mais desfavoráveis, podendo explicar o prognóstico mais adverso associado à expressão desta molécula pelas células B de LLC-B. Já a fraca expressão de CD38 foi observada nos casos da del 13q, que por sua vez está associada a um prognóstico mais favorável (Quijano et al., 2008).

VI- Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo revelaram alterações numéricas e fenotípicas nas células B normais residuais da medula óssea de doentes com diagnóstico de LLC-B. Algumas destas alterações parecem estar relacionadas com alterações genéticas frequentemente observadas nesta entidade.

VII- Bibliografia

Virella G., Goust J, Medical Immunology. Marcel Derkker. (2001). p.11-13.

Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A, Schmitz, A, Almeida, J., Vogt, R. F., et al. (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 78 Suppl 1(May), p.47–60.

Cruse J., Lewis R., Atlas of Immunology, 3-ªedition. Kindle Edition. (2010). p.215-230.

Acosta-Rodríguez, E. V., Merino, M. C., Montes, C. L., Motrán, C. C., & Gruppi, • A. (2007). Cytokines and chemokines shaping the B. Cytokine e Growth Factor Reviews, volume 18, Issue 1, p. 73-83.

Ciudad, J., Orfão, A., Vidriales, B., Macedo, A., Martínez, A., González, M., López-Berges, M., Valverde, B., Miguel, J. (1998). Immunophenotypic analysis of CD19⁺ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica*, p.1069-1075.

Carsetti, R. (2000). The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *The Journal of experimental medicine*, 191(1), p.5–8.

Goldsby R., Kindt T., Kuby J., Osborne B., Immunology, 5-ªedition. W.H. Freeman.(2006). p. 248-271.

LeBien T., Tedder T., (2008) B lymphocytes: how they develop and fuction. *Blood*. p.1570-1580.

Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*, 20(6), p.707–718.

Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Busslinger M. (2011). Pax5 a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Advance in Immunology*. 111, p.179-206.

Arosa F., Cardoso E., Pacheco F., (2007). Fundamentos de Imunologia. Lidel. p. 165-169.

Hsi, E. D. (2012). Pathologic and molecular genetic features of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*, 39(1), 74–9.

Allen, C. D. C., Okada, T., e Cyster, J. G. (2007). *NIH Public Access*, 27(2), 190–202.

Montserrat, E., & Moreno, C. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19 Suppl 7(Supplement 7), vii320–5.

Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J. M., Barrena, S., Sánchez, M. L., Teodosio, C., et al. (2008). Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 74(3), 139–49.

Tangye, S. G., e Tarlinton, D. M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European journal of immunology*, 39(8), 2065–75.

Fecteau, J. F., e Néron, S. (2003). CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(9), 4621–9.

Wang, X. D., Wang, L., Ji, F. J., Zhu, J. M., Ayana, D. a, e Fang, X. D. (2012). Decreased CD27 on B lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *The Journal of international medical research*, 40(1), 307–16.

Dronca, R. S., Jevremovic, D., Hanson, C. A., Rabe, K. G., Tait, D., Morice, W. G., Call, T. G., et al. (2011). Diagnosis and prognosis of a heterogeneous disease entity, 78(Suppl 1), 1–15.

Orfão, A., Almeida, J., Sanchez, M.L., San Miguel, J.F. (2008). Immunophenotypic Diagnosis of Leukemic B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders Other Than Chronic Lymphocytic Leukemia. *Contemporary Hematology*. (09), 173-190.

Van Lochem, E. G., Van der Velden, V. H. J., Wind, H. K., te Marvelde, J. G., Westerdal, N. a C., e van Dongen, J. J. M. (2004). Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 60(1), 1–13.

Dronca, R. S., Jevremovic, D., Hanson, C. a, Rabe, K. G., Shanafelt, T. D., Morice, W. G., Call, T. G., et al. (2010). CD5-positive chronic B-cell lymphoproliferative disorders: diagnosis and prognosis of a heterogeneous disease entity. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 78 Suppl 1(May), S35–41.

Ibrahim, S. (2001). CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98(1), 181–186.

Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., et al. (2003). The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, 101(4), 1262–9.

Vroblova, V., Smolej, L., Krejsek, J., (2012). Pitfalls and limitations of ZAP-70 detection in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 17(5):268-74.

Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K. R., Weiss, A., & Kipps, T. J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(13), 4609–14.

Palumbo, G. a, Parrinello, N., Fargione, G., Cardillo, K., Chiarenza, A., Berretta, S., Conticello, C., et al. (2009). CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, 33(9), 1212–6.

Dorfman, D. M., & Shahsafaei, A. (2010). CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in b cell-derived neoplasms. *American journal of clinical pathology*, 134(5), 726–33.

Matutes, E. (2002). New additions to antibody panels in the characterisation of chronic lymphoproliferative disorders. *Journal of clinical pathology*, 55(3), 180–3.

Jevremovic, D., Dronca, R., Morice, W., McPhail, E., Kurtin, P., Zent, C., Hanson, C., (2010) CD5+ B-cell lymphoproliferative disorders: Beyond chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Elsevier*, 34(9), 1235-1238.

Cavalcanti Júnior, G. B., Sales, V. S. D. F., Cavalcanti e Silva, D. G. K., Lopes, M. C. D. A., Paiva, A. D. S., da Fonseca, H. E. M., do Nascimento Júnios, F. F., et al. (2005). Detection of CD5 in B-cell chronic lymphoproliferative diseases by flow cytometry: a strong expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, 20 Suppl 1, 101–7.

Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., e Isaacson, P. G. (2008). Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112(12), 4384–99.

García-Muñoz, R., Galiacho, V. R., e Llorente, L. (2012). Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of hematology*, 91(7), 981–96.

Pluta A., Gorski A., Nowaczyk M., Modlinska M., (1990). Normal B Cell compartment in Chronic lymphatic leukemia. *Hematology Oncology*. 8 (3); 121-4.

Sargent, R. L., Craig, F. E., e Swerdlow, S. H. (2009). Comparison of Bcl-2 , CD38 and ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia, 574–582.

Morabito, F., Mangiola, M., Rapezzi, D., et al.; (2003). Expression of CD10 by B- chronic lymphocytic leukemia cells undergoing apoptosis in vivo and in vitro. *Chronic Lymphoproliferative Disorders*. 88 (08), 864-872.

Zapata, M., Budnick, S. D., Bordoni, R., e Li, S. (2010). Case Report lymphoma mimics follicle center B cell lymphoma, 3(4), 430–436.

Misawa. Y., Nagaoka. H., et al., (1996). CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 321, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. 26(11), 2573-81.

Tsao, L., e Colovai, A. I. (2005). Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolour flow cytometric analysis, (September 2003), 820–823.

Schlette, E., Medeiros, L. J., Keating, M., & Lai, R. (2001). CD79b Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Association With Trisomy 12 and Atypical Immunophenotype, 8–13.

Mccarron, K. F., Hammel, J. P., & Hsi, E. D. (2000). Usefulness of CD79b Expression in the Diagnosis of B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders, 805–813.

Rolinski J., Rupniewska ZM., Dmoszynska A., et al., (1999). Cd43 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. 102 (3): 753-62.

Tsao, L., & Colovai, A. I. (2005). Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolour flow cytometric analysis, (September 2003), 820–823.

Olteanu, H., Fenske, T. S., & Harrington, A. M. (2011). CD23 Expression in Follicular Lymphoma Clinicopathologic Correlations CME / SAM, 46–53.

Diraimondo, F., Albitar, M., Huh, Y., Brien, S. O., Montillo, M., Tedeschi, A., Kantarjian, H., et al. (2002). The Clinical and Diagnostic Relevance of CD23 Expression in the Chronic Lymphoproliferative Disease, (CII).

Ghia, P. (2007). Chronic lymphocytic leukemia, 64, 234–246.

Manuscript, A., Usefulness, D., & Myeloma, P. C. (2013). NIH Public Access, 137(1),93–100.